

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Sistema OXPHOS: Integración funcional de dos genomas

Memoria presentada por

Ana Latorre Pellicer

Licenciada en Veterinaria

Para optar al Grado Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2014

Director de Tesis

José Antonio Enríquez Domínguez

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

D. JOSÉ ANTONIO ENRIQUEZ DOMINGUEZ, coordinador del programa de Homeostasis y Reparación Tisular, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral “**Sistema OXPHOS: Integración funcional de dos genomas**” ha sido realizada en el Departamento de Desarrollo y Reparación Cardiovascular en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, bajo su dirección y tutela y que reúne, a su juicio, las condiciones para optar al grado Doctor.

Madrid, Abril 2014

Fdo: José Antonio Enríquez

Agradecimientos

Ya es la décima vez que me siento a escribir estas líneas, y, definitivamente, no soy capaz de reflejar por escrito el alcance de la gratitud que siento por todos los que me habéis acompañado durante estos años. No voy a conseguir hacer un listado y una enumeración completa, pero sí que puedo englobar en una sola frase el más sincero de mis agradecimientos:

¡Gracias a todos vosotros, porque sois los responsables de que haya disfrutado muchísimo durante estos años y haya sido feliz haciendo este trabajo!

Una de las cosas más bonitas de este trabajo es que todos los días tienes que enfrentarte a nuevas situaciones, nuevas preguntas, nuevos conceptos... y todos los días aprendes algo nuevo. He tenido muchísima suerte, porque en cada nuevo reto que se me ha ido presentando, siempre he podido contar con alguien dispuesto a enseñar y ayudarme. Los resultados aquí presentados son producto de un gran trabajo colectivo, y es imprescindible que haga un reconocimiento y agradecimiento a todas aquellas personas que habéis confiado en el proyecto y dedicado lo mejor de vosotros mismos para que salga adelante. Además, también quiero aprovechar este espacio para expresar mi más sincero cariño y gratitud a todos los que habéis hecho posible que, durante estos años, también me haya podido desarrollar personal y profesionalmente.

Gracias **Toño**, porque has hecho un gran esfuerzo por ser un buen didacta a la vez que director; porque me has impulsado a desarrollar la imaginación, para luego enseñarme a canalizar todos esos pensamientos hacia ideas fundamentadas. Gracias por brindarme segundas oportunidades cuando he cometido errores, por haber confiado siempre en mí, y por abrirme todas las puertas que has podido.

Gracias **Aciselo** y **Patricio**, por enseñarme desde el ejemplo, por vuestro compromiso con este trabajo, y porque siempre he podido contar con vosotros.

Mi primera maestra, compañera y amiga en este doctorado: **Patricia**, gracias de corazón por tu cariño, por haberme enseñado a desenvolverme en el mundo de la investigación; porque a ti, junto con **Erika**, **Nuria**, **Pilar**, **Raquel**, **Nieves**, **Ester** y **Esther** os tengo que agradecer gran parte de lo que he aprendido, pero, sobretodo, cómo lo he aprendido. Porque, pese a los medios disponibles; la investigación científica está hecha por personas, sustentada siempre sobre una base firme: el rigor. Gracias por enseñarme a tenerlo siempre en cuenta.

Gracias a **Rebeca**, **Sara**, **Conchi**, **Carmen**, **Cristiane** y **Umut**, por vuestra ayuda incondicional, por darme ánimos cuando más los he necesitado, porque cada uno de vosotros con vuestra experiencia previa y con vuestro ejemplo me habéis enseñado que el esfuerzo y la constancia son imprescindibles en este trabajo.

Gracias a **Andrés**, **Isabel** y **Marta** por vuestra amabilidad e implicación en este trabajo; muy especialmente a Andrés, un gran compañero de poyata y trabajador inagotable!

Adela, **Ricardo**, **Elena** y **Edu**, no podéis imaginar lo afortunada que me siento por haberos tenido de compañeros y amigos. Habéis sido un gran apoyo y una muy buena influencia, pues, con muchísimo cariño, me habéis ido introduciendo en aquellas cosas que ignoro, explicándome conceptos básicos y no tan básicos, incitándome a estudiar para aprender más, y enseñándome a dudar de lo que aprendo. Con vosotros he aprendido a aprender. Muchísimas gracias.

Gracias a **Rocio, Elena, Ana y Cristina**; porque a veces se hace difícil mantener la ilusión, y con vuestra emoción y entusiasmo diario en el trabajo, me habéis dado esa pequeña dosis de fuerza que me faltaba en esta última etapa.

Sin lugar a dudas, he trabajado en un grupo excelente, pero además he tenido la suerte de trabajar en varios entornos excepcionales que me han permitido conocer a grandes profesionales con los cuales he podido compartir, colaborar y aprender.

Luis Miguel, Chema, David y Juan, desde estas líneas os quiero agradecer de todo corazón la disposición y confianza que me habéis brindado, sin decaer en ningún momento. Gracias por intentarlo hasta conseguirlo. Porque gracias a que me habéis ido proporcionando todo el material de partida, he podido llevar a cabo gran parte de este proyecto. Muchas gracias por vuestro esfuerzo.

Gracias **Fátima y Carlos**, por involucraros en el proyecto, entenderlo y estudiarlo, para finalmente aplicarle vuestros conocimientos. Y aunque aun estoy lejos de llegar a entender “vuestros análisis”, gracias por intentar hacer que lo comprenda.

Gracias a **Iain y Nick**, por vuestro tremendo trabajo en el análisis de datos, por vuestro interés, y por desarrollar los modelos matemáticos más apropiados.

Gracias **Mercedes**, ha sido una suerte aprender de una grandísima profesional; **Ana, Frank, Marta, Virginia, Esther, Tamara, Antonio, Iria e Iván; Isabel, Santiago, Rubén y Marta**. Y por supuesto a **Roisin y Antonio** (un gran profesor!). A todos los miembros del grupo de Medicina Comparada, gracias por vuestra ayuda desinteresada, por vuestras sugerencias y observaciones, por resolver siempre todas mis dudas, por vuestro tremendo trabajo y por todas la gestión realizada durante todos los días del año. Gracias por hacerlo fácil, y por ayudarme siempre con la mayor amabilidad.

Gracias a **Miguel y Cristina**, que os habéis interesado en el trabajo desde el inicio, cuando tan sólo eran hipótesis, y habéis ido aportando grandes consejos, ideas y ayuda en momentos claves. Gracias a **Nacho y Esther**, por vuestro entusiasmo y por aplicar vuestros conocimientos y experiencia al proyecto.

Gracias a todos los compañeros del departamento, por el día a día, por compartir y aportar vuestras ideas y conocimientos, y por la amistad que muchos de vosotros me habéis brindado! Gracias a **Ileana, Thamas, Piedad, Jesús...** por esas discusiones tan enriquecedoras. Gracias al grupo de **Enrique, Mercedes y Susana**, con los que cada jueves hemos discutido sobre el trabajo, al grupo de **María y Sonsoles**, que tan bien nos acogisteis cuando llegamos. Gracias a **Mari**, por hacer tan cómodo el trabajo diario y por preocuparte tanto por mi, y también a **Teresa, Ángel y Beatriz**, por la magnífica organización, a **Marta** por facilitarme siempre el tedioso trabajo de “papeleos”. Gracias a **Simon**, por la ayuda con la escritura. Gracias a **Fran, María y Paco, Carlos, Helena y David**, a **Jaime y Borja**, por las colaboraciones tan interesantes y por enseñarme nuevas perspectivas. Este párrafo podría ser interminable, sin lugar a dudas ha sido una suerte poder desarrollar gran parte de esta tesis doctoral en el CNIC, donde tantas interacciones humanas y científicas se pueden establecer. Por eso, muchísimas gracias a todos! Desde aquí, también quiero agradecer y hacer un reconocimiento muy especial a todas las personas que formáis parte de las unidades técnicas, desde microscopía, genómica,

pasando por cultivos celulares, celómica... a todos los de la “4º planta”, a esterilización, almacén, compras, biblioteca, informática... gracias, porque sin vuestra eficiencia no sería posible trabajar con tanta fluidez.

Anu, gracias por darme la oportunidad de aprender en tu laboratorio, por mostrarme otras perspectivas y puntos de vista, y por las discusiones tan interesantes sobre el proyecto. A **Riikka** y a todos los compañeros de Biomedicum, gracias por 10 meses maravillosos, y porque ha sido una gran experiencia de la cual he aprendido muchísimo.

Y aunque hayan pasado varios años, no me puedo olvidar de **Manolo y Carmen**, de **Julio y Eduardo**, de **Pepín y Tere**, de **Santi**, de **Alicia y Eduardo**, de **Iñigo, Malena, Marora, David** ... y una larga lista de compañeros que hicisteis que me “enganchase” a este trabajo en mis inicios en Zaragoza, y a los que siempre os recuerdo con un gran afecto.

¡Gracias a todos, porque ha sido un placer trabajar con vosotros!

Por último, me gustaría hacer un especial agradecimiento a mi familia y amigos, porque es una suerte sentirse siempre acompañada y arropada, y porque no hay nada que pueda motivar y animar más a continuar que el sentimiento de que las personas a las que más quieres valoran tu trabajo. Por todo eso y mucho más, este trabajo también os pertenece. Muy especialmente, gracias Miguel, por estar incondicionalmente siempre a mi lado, por ayudarme a fortalecer mis debilidades, por ser mi parte racional, y principalmente, por hacerme feliz. Esta tesis se la quería dedicar con todo mi cariño a mis padres, porque vosotros sois los responsables de que hoy sea quién soy y cómo soy. ¡Gracias!

Resumen

El DNA mitocondrial (mtDNA) es peculiar por muchos aspectos: es circular, extranuclear y poliploide, no tiene intrones, es transmitido uniparentalmente (no cumple las reglas mendelianas), no sufre recombinación y tiene su propio código genético. Si se valora la trascendencia del mtDNA por el tamaño genómico, podría ser considerado casi irrelevante: tan solo 16.569 pb que codifican para 13 proteínas mitocondriales, frente a más de los 3,3 billones de pb del genoma nuclear (nDNA) que codifican para más de 1000 proteínas mitocondriales. Pero, de su relevancia da idea el esfuerzo energético de la célula en su mantenimiento, ya que en términos de masa, el mtDNA representa en torno al 1-3% del DNA celular total, encontrándose en el rango de cualquier otro cromosoma, y alcanza hasta un 35% del DNA total de un oocito.

El mtDNA concentra un número estable de polimorfismos en regiones codificantes que definen los llamados haplogrupos mitocondriales. Aunque durante mucho tiempo esta diversidad genética fue considerada funcionalmente irrelevante, en los últimos años la neutralidad funcional de las variantes de mtDNA se encuentra en constante debate. En este trabajo se ha abordado el estudio de las implicaciones funcionales de la variabilidad poblacional del mtDNA, teniendo en cuenta el doble origen genético de la cadena de transporte de electrones (mETC), en modelos murinos.

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) es el único proceso de las células animales cuyos componentes están codificados en dos genomas (mtDNA y nDNA). Por ello proponemos que se pueden generar diferentes grados de ajuste estructural entre los productos génicos nucleares y mitocondriales, concepto que, para distinguirlo del desajuste patológico, denominamos “mismatch intrínseco del nDNA/mtDNA”. Esta hipótesis predice que para un determinado haplotipo de mtDNA, su combinación con diferentes componentes nucleares puede generar un rendimiento variable de la mETC (no patológico) que puede ser detectado a nivel celular desencadenando cascadas de señalización y adaptación específicas.

Para evaluar este fenómeno se han usado ratones conplásticos (idéntico nDNA y distinto mtDNA) y heteroplásmicos (contienen dos variantes de mtDNA en la misma célula). De este modo se ha puesto de manifiesto la relevancia del “mismatch nDNA/mtDNA”, y por tanto las implicaciones funcionales de las variantes de mtDNA, en tres puntos claves de la vida de un individuo: (i) durante el desarrollo embrionario, donde un nuevo contexto nuclear se enfrenta a una variante de mtDNA, (ii) en un individuo formado, donde diferentes contextos nucleares y funcionales conviven en los diferentes tipos celulares, (iii) y durante el proceso de envejecimiento, cuando se produce un declive en la capacidad homeostática celular.

Summary

Mitochondrial DNA (mtDNA) is peculiar in many aspects: it is circular, extranuclear, polyploid, lacks introns, is uniparentally transmitted (and therefore does not follow mendelian inheritance patterns), does not undergo recombination, and has its own genetic code. In terms of genome size, mitochondrial DNA (mtDNA) could be considered almost irrelevant: 16,569 bp in the mtDNA, encoding only 13 proteins, compared with more than 3.3 billion bp in the nuclear genome, including genes codifying more than 1000 mitochondrial proteins. However, all cells invest a considerable effort in maintaining this small and odd genome. Thus, around 1-3% of the total DNA is mtDNA in a regular cell, and this figure can rise to an incredible 35% in the oocyte.

The peculiarity of mtDNA genetics generates a high level of sequence diversity between individuals and human populations, known as mtDNA haplogroups. This diversity was long considered to functionally irrelevant, but this view has now been challenged for more than a decade. Using mice as a model, we have taken into account the double genetic origin of the electron transport chain (mETC) to investigate the possible functional consequences of different mtDNA variants.

The OXPHOS system is genetically unique in being the only process in animal cells that requires components encoded in two genomes, mtDNA and nuclear DNA (nDNA). We hypothesize that functional OXPHOS can be generated at high frequency with different degrees of mismatch between mtDNA and nDNA OXPHOS genes; we refer to this as “intrinsic mismatch” to fully distinguish it from pathological mismatch. This proposal predicts that combination of a given non-pathological mtDNA haplotype with different nDNA components would generate distinguishable (yet non-pathological) performance of mtETC. Thus, within certain limits of mismatch, the activity of the OXPHOS system is sensed by the cell, which reacts to optimize its performance to match its specific requirements.

We have investigated this concept using conplastic mice (with identical nuclei but interchanged mtDNA) and heteroplasmic mice (containing two mtDNA variants in the same cell). These approaches have revealed the importance of intrinsic mismatch, and therefore the functional implications of mtDNA variants, at three key levels: (i) during embryo development, when a mtDNA variant is confronted with a new nuclear context; (ii) in different cellular and functional contexts within individuals; and (iii) during aging, when there is a decline in homeostatic capacity.

Índice

Agradecimientos.....	5
Resumen	11
Summary.....	15
Índice	19
Abreviaturas	25
Introducción.....	33
I. La mitocondria: un orgánulo dinámico	35
I.1 Morfología y contenido	35
I.2 Dinámica mitocondrial.....	36
II. La mitocondria: un orgánulo versátil	38
II.1 Diversidad funcional: Divergencia de rutas metabólicas	38
II.2 Diversidad estructural: Formación de supercomplejos y versatilidad	40
II.3 Diversidad en la señalización: sensores y mecanismos mitocondriales para regular el metabolismo.....	42
II.3.1 Especies reactivas de oxígeno como señalizadoras	44
II.3.2 Mitohormesis	45
III. La mitocondria: un orgánulo sinérgico.....	47
III.1 Sinergia de dos genomas: nuclear y mitocondrial	47
III.1.1 Características del genoma mitocondrial	47
III.1.2 Expresión coordinada de dos genomas, biogénesis mitocondrial y control de calidad.	48
III.1.3 Interacción de proteínas nucleares y mitocondriales.....	49
III.2 Variabilidad poblacional del mtDNA	50
III.3 Etiología y segregación de mutaciones patológicas del mtDNA	52
III.4 Heteroplasmia y segregación	53
Antecedentes y Objetivos	59
I. Antecedentes.....	61
II. Objetivos	62
Material y Métodos	63
I. Material y métodos: modelos animales	65
I.1. Condiciones de alojamiento y experimentación.....	65

I.2. Generación y mantenimiento de los modelos animales	65
I.2.1 Generación, mantenimiento y genotipado de ratones conplásticos	65
I.2.2 Generación, mantenimiento y genotipados de los ratones heteroplásmicos.....	70
I.2.3 Generación, mantenimiento y genotipado de ratones quiméricos	74
I.3. Cuantificación de la heteroplasma	75
I.3.1 RFLP G4276A y Bromuro de Etidio	75
I.3.2 RFLP G4276A y SYBR Green	76
I.3.3 Análisis de variación de un nucleótido por minisecuencia en fase sólida	77
I.4. Determinaciones de la función mitocondrial.....	80
I.4.1 Determinación del H ₂ O ₂ en tejidos mediante el uso de la sonda Mito B.....	80
I.4.2 Aislamiento de mitocondrias a partir de tejidos de ratón: hígado	81
I.4.3 Ensayo de Síntesis de ATP	82
I.4.4 Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas	84
I.4.5 Cuantificación del número de copias de mtDNA por RT-PCR.....	86
I.5. Extracción y genotipado de ovocitos y embriones de ratón.....	88
I.5.1 Extracción y genotipado de oocitos	88
I.5.2 Extracción y genotipado de embriones	88
I.6. Procedimientos animales generales.....	90
I.6.1 Estudios clínicos	90
I.6.2 Dietas y administración de drogas	92
I.7. High Throughput Screening	93
I.7.1 RNAseq.....	93
I.7.2 Metabolómica	95
I.7.3 Cuantificación por FISH de la longitud telomérica	96
II. Material y Métodos: Cultivos celulares	98
II.1. Medios de cultivo.....	98
II.2. Fibroblastos Embrionarios de ratón (MEFs)	99
II.2.1 Preparación de MEFs	99
II.2.2 Inmortalización de MEFs	99
II.3. Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSCs).....	100
II.3.1 Generación de iPSC.....	100
II.3.2 Caracterización de células pluripotentes inducidas (iPSCs).....	101
Resultados.....	105
I. Generación de modelos animales	107
I.1. Ratones conplásticos.....	107
I.2 Ratones heteroplásmicos.....	110
I.3 Ratones quiméricos mitocondriales	110
I.4 Características de los modelos animales.....	111

II. Implicaciones fenotípicas de las variantes del DNA mitocondrial	113
II.A Implicaciones fenotípicas de las variantes de mtDNA <i>in vivo</i> en animales jóvenes	113
IIA.1. Evaluación de la función mitocondrial	113
IIA.2 Evaluación de la ganancia de peso y actividad	115
IIA.3 Evaluación del perfil trasncriptómico	117
IIA.4 Evaluación del perfil metabólico	120
IIA.5 Evaluación de las implicaciones del mtDNA en el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos	125
IIA.6 Discusión (1)	126
II.B Implicaciones fenotípicas de las variantes de mtDNA <i>in vivo</i> en animales adultos	129
IIB.1 Valoración de la evolución del peso y signos fenotípicos	129
IIB.2 Evaluación de aspectos metabólicos	131
IIB.3 Estudio de la evolución de la función mitocondrial con la edad	133
IIB.4 Análisis de la evolución de la longitud telomérica	134
IIB.5. Discusión (2)	136
III. Estudio de la segregación selectiva del mtDNA	141
IIIA. Estudio de la segregación selectiva del mtDNA en tejidos somáticos	141
IIIA.1 Introducción al estudio y descripción de la segregación selectiva del mtDNA	141
IIIA.2. Modulación de la segregación selectiva del mtDNA	146
IIIA.3. Evaluación del nivel de selección: intra- o inter- celular	151
IIIA.4 Discusión (3)	156
IIIB. Estudio de la segregación del mtDNA en la transmisión intergeneracional ...	160
IIIB.1 Transmisión intergeneracional de la heteroplasmia	160
IIIB.2 Segregación del mtDNA y pluripotencia	165
IIIB.3 Los ROS y la segregación del mtDNA durante el desarrollo embrionario	170
IIIB.4 Implicaciones del <i>mismatch nDNA/mtDNA</i> en la segregación del mtDNA durante el desarrollo embrionario	171
IIIB.5 Discusión (4)	173
Discusión	177
Conclusiones	183
Conclusions	187
Bibliografía	191

Abreviaturas

Las abreviaturas corresponden a definiciones en inglés y se ha mantenido para conservar la nomenclatura estándar.

aa:	aminoácido
AAA:	ATPasa asociada a diversas actividades
AcCoA:	acetil coenzima A
ACN:	acetonitrilo
ADP:	adenosín difosfato
Ad-PEO:	oftalmoplejia externa progresiva autosómica dominante
AKT:	proteína kinasa B
AMP:	adenosín monofosfato
AMPK:	kinasa activada por monofosfato de adenina
ANT:	transportador de nucleótidos de adenina
AP:	fosfatasa alcalina
APS:	persulfato amónico
ATP:	adenosín trifosfato
ATPasa:	ATP sintetasa
au:	unidades arbitrarias
BrEt:	bromuro de etidio
BSA:	albúmina sérica bovina
Btn:	biotinilado
CI:	complejo I
CII:	complejo II
CIII:	complejo III
CIV:	complejo IV
CO_n o COX_n:	subunidad de la citocromo c oxidasa
CoQ:	coenzima Q
COX:	citocromo c oxidasa
CPEO:	síndrome de oftalmoplejía externa progresiva crónica
Cpm:	cuentas por minuto
CS:	citrato sintasa
Ct:	Ciclo umbral (<i>Cycle threshold</i>)
CV:	complejo V
Cyt b:	citocromo b
Cyt c:	citocromo c
DCA:	dicloroacetato
DNA:	ácido desoxirribonucleico
cDNA:	cadena codificante de DNA
mtDNA:	DNA mitocondrial

nDNA:	DNA nuclear
dNTP:	desoxirribonucleótido trifosfato
dpc:	día post-coito
dox:	doxiciclina
Drp1:	proteína realacionada con la dinamina-1
Dt:	tiempo de duplicación
DTNB:	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
DTT:	ditiotreititol
E8C:	embrión de 8 células
ESCs:	células embrionarias pluripotentes (<i>embryonic stem cells</i>)
FA:	ácido fórmico
FADH₂:	dinucleótido de flavina y adenina reducido
Fc:	cambio, (<i>fold change</i>)
FDR:	razón de falsos descubrimientos, (<i>false discovery rate</i>)
Fe-S:	centro sulfoférico
FIS:	proteína de fisión mitocondrial
FMN:	mononucleótido de flavina
Fw:	hacia delante (<i>forward</i>)
G:	gauge
G3P:	glicerol-3-fosfato
GAPDH:	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDH:	glutamato deshidrogenasa
GGT:	γ -glutamil-transferasa
GSEA:	<i>Gen Set Enrichment Analysis</i>
GSH:	glutación reducido
GSH-Px:	glutación peroxidasa
GSSG:	glutación oxidado
GTPasa:	guanosina trifosfatasa
H:	heteroplasma
HCG:	gonadotropina coriónica humana (<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>)
HE:	hematoxilina-eosina
HFD:	dieta alta en grasa, (<i>High Fat Diet</i>)
HIF:	factor inducible por hipoxia, (<i>Hypoxia-inducible factor</i>)
HMG:	grupo de proteínas de alta movilidad
HOMA:	<i>homeostasis model assesment</i>
HR:	humedad relativa
HSC:	células madre hematopoyéticas, (<i>hematopoietic stem cells</i>)
Hsp:	proteína de choque de calor (<i>heat shock protein</i>)
Ht:	heteroplasma transformada

IGF:	factores de crecimiento insulínicos
IPA:	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
iPSCs:	Células Madre Pluripotentes inducidas, (<i>Induced pluripotent Stem Cells</i>)
IR:	resistencia insulina
IRS:	receptor de insulina
I.V.:	intravenosa
kb:	kilo bases
KCN:	cianuro potásico
kDa:	kilo Daltons
Klf4:	<i>Krueppel-Like Factor 4</i>
KO:	<i>Knock-out</i>
KS:	Kearn-Sayre
LC-MS:	Cromatografía líquida-espectrometría de masas (Liquid chromatography-mass spectrometry)
LHON:	Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber
LIF:	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MEFS:	fibroblastos embrionarios de ratón, (<i>Mouse embryonic fibroblast</i>)
MELAS:	Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebro-vasculares (<i>Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes</i>)
MERF:	síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas, (<i>Myoclonus epilepsy ans ragged-red fibers</i>)
MI:	<i>mismatch</i> intrínseco
Mfn:	mitofusina
MKOS:	<i>Myc, Klf4, Oct-4, Sox-2</i>
MSEA:	<i>Metabolite Set Enrichment Analysis</i>
Mt:	mitocondria
mETC:	cadena de transporte de electrones mitocondrial
mTERF:	factor de terminación de la transcripción mitocondrial
mtRPOL:	RNA polimerasa mitocondrial
mtTFA o TFAM:	factor de transcripción mitocondrial A
mtTFB o TFBM:	factor de transcripción mitocondrial B
NAC:	N-Acetil-cisteína
NAD⁺:	dinucleótido de nicotinamina y adenina
NADH:	dinucleótido de nicotinamina y adenina reducido
NARP:	Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa
NBT:	nitroazul de tetrazolio, (<i>Nitro blue tetrazolium</i>)
NDn:	NADH deshidrogenasa (ND1-ND6 y ND4L)

NMN:	nicotinamida mononucleótido
NR:	nicotinamida ribosa
NRF:	factor nuclear de respiración
nt:	nucleótidos
NTP:	ribonucleótido trifosfato
OAA:	oxalacetato
Oct4:	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
OMA1:	<i>zinc Metaloproteasa OMA1</i>
O/N:	toda la noche, (<i>over night</i>)
OPA1:	proteína de la atrofia óptica-1
OXPHOS:	fosforilación oxidativa
PB:	<i>PiggyBac</i>
pb:	pares de bases
PBase:	<i>PiggyBac</i> transposasa
PCA:	análisis de componentes principales
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PDH:	piruvato deshidrogenasa
PDK:	piruvato deshidrogenasa kinasa
PFA:	paraformaldehído
PGC-1:	coactivador del receptor del proliferador peroxisomal activado γ
PGCs:	células primordiales Germinales (<i>Primordial germ cells</i>)
Pi:	fosfato inorgánico
PK:	proteínasa k
PLS:	regresión de mínimos cuadrados parciales
PMSG:	gonadotropina sérica de yegua preñada (<i>Pregnant Mare's Serum Gonadotropin</i>)
Pol γ:	DNA polimerasa γ mitocondrial
PPAR:	receptor del proliferador peroxisomal activado
PRC:	coactivador relacionado con PGC-1
PS:	Síndrome de Pearson
PTEN:	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF:	fluoruro de polivinilideno
Q-FISH:	hibridación fluorescente in situ cuantitativa
Rcf:	<i>Respiratory Supercomplex factor</i>
RIN:	<i>RNA integrity number</i>
RNA:	ácido ribonucleico
mRNA:	RNA mensajero
rRNA:	RNA ribosómico
siRNA:	RNA de interferencia (<i>small interference RNA</i>)

tRNA:	RNA de transferencia
RNAseq:	secuenciación de RNA (<i>RNA sequencing</i>)
RFLP:	polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RNS:	especies Reactivas de Nitrógeno
ROS:	especies Reactivas de Oxígeno
Rpm:	revoluciones por minuto
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
Rv:	reverso (<i>reverse</i>)
SC:	Supercomplejos respiratorios
SCAFI:	<i>Supercomplexes Assembly Factor I (Cox7a2l)</i>
SD:	desviación estándar
SDH:	succinato deshidrogenasa
SEM:	error estándar de la media
SFB:	suero fetal bovino
Sirt:	sirtuina
SNP:	Polimorfismo de nucleótido simple, (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SOD:	Superóxido Dismutasa
Cu/ZnSOD:	Superóxido dismutasa citoplasmática (Cu/Zn)
MnSOD:	Superóxido dismutasa mitocondrial (Mn)
Sox-2:	<i>Sex determining Region Y-box2</i>
TEF:	tampón de electrofusión
TEMED:	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
Tm:	temperatura de fusión
TPP:	trifenilfosfónico
UCP:	proteína desacoplante (<i>Uncoupling Protein</i>)
UI:	unidades internacionales
UPRmt:	respuesta a proteínas desplegadas, (<i>mitochondrial unfolding protein response</i>)
UQ₂H₂:	ubiquinol
UV:	ultravioleta
ZP:	zona pellucida
Ψ_{mt}:	potencial de membrana mitocondrial

Introducción

I. La mitocondria: un orgánulo dinámico

I.1 Morfología y contenido

Las mitocondrias son orgánulos presentes en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas, con algunas excepciones como eritrocitos maduros y algunas especies de protistas (Cavalier-Smith, 1987; Embley and Martin, 2006). Estructuralmente la mitocondria está formada por dos membranas que definirán diferentes compartimentos. Una membrana externa (60% proteínas, 40% lípidos) (Palade, 1953) que la separa del citoplasma, pudiendo asociarse físicamente al retículo endoplásmico (RE) a través de los estrechos contactos llamados MAM (Membrana de RE Asociada a Mitocondria) (Hayashi et al., 2009) (Marchi et al., 2014) y que es permeable a todas aquellas moléculas inferiores a 10kDa., y la membrana interna, que tiene alto contenido en proteínas (80% proteínas, 20% lípidos) y que constituye una membrana muy selectiva al paso de moléculas, permitiendo mantener el gradiente electroquímico de protones. La membrana interna separa la matriz del espacio intermembrana, y en ella se pueden distinguir dos dominios estructural y funcionalmente diferentes, uno que se encuentra en aposición con la membrana externa con bajo contenido en complejos respiratorios pero que concentra la maquinaria de transporte de proteínas a la mitocondria; y otro que forma las crestas mitocondriales y contiene la mayor parte de los complejos respiratorios. Estas dos regiones de membrana interna definen a su vez dos compartimentos adicionales, el espacio intermembranas y las cisternas de las crestas. Por último, en el interior de la mitocondria se define un quinto compartimento, matriz mitocondrial. Este último alberga las moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) y proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas encargados de la traducción de proteínas codificadas en dicho genoma, así como otras proteínas implicadas en procesos metabólicos como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea o la biosíntesis de pirimidinas (Frey and Mannella, 2000; Logan, 2007).

Una de las principales características de las mitocondrias, es que son orgánulos muy plásticos y dinámicos. El número de mitocondrias presentes en cada célula, su morfología y su localización, dependerá tanto del tipo celular como del estado metabólico de la misma (Campello and Scorrano, 2010) (*Figura I.1*). Pero además de la variabilidad morfológica, presentan una gran variabilidad en composición. Gracias a la combinación de la proteómica, genómica y bioinformática hoy se conocen más de 1000 proteínas que forman parte de la mitocondria, pero es curioso que las mitocondrias de distintos tejidos comparten sólo alrededor del 75% de sus componentes (Pagliarini et al., 2008). La composición mitocondrial es plástica por naturaleza, variando entre especies (Sickmann et al., 2003) y en respuesta a necesidades

celulares y tisulares específicas (Forner et al., 2006). Esta heterogeneidad tisular tiene un amplio rango de consecuencias funcionales, y pone de manifiesto que la función mitocondrial es específica de tejido (Rackham and Filipovska, 2014), aunque las consecuencias de esta diversidad y especificidad celular aun no se conocen.

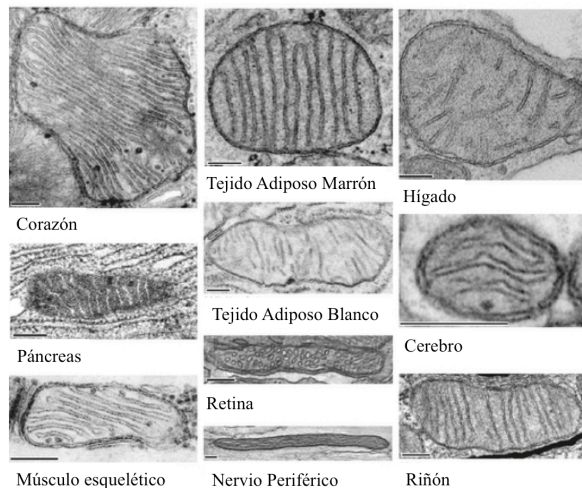


Figura 1.1: Heterogeneidad en la morfología mitocondrial tejido-específica. La micrografía electrónica de mitocondrias de varios tejidos resalta la diversidad morfológica mitocondrial entre tejidos. Imagen tomada de (Vafai SB and Mootha VK, 2012).

I.2 Dinámica mitocondrial

El concepto de dinámica mitocondrial surge de la observación de que las mitocondrias son orgánulos dinámicos y móviles, sometidos a constantes eventos de fusión y fisión, formando una red heterogénea (Liu et al., 2009; Picard et al., 2013). La dinámica mitocondrial desempeña una papel crítico en la biología del orgánulo, especialmente en su biogénesis y control de calidad, en la viabilidad celular, en la función bioenergética, en su papel en señalización intracelular y la senescencia (Liesa and Shirihai, 2013; Twig et al., 2008).

La mitocondria sufre continuos ciclos de fusión y fisión, un breve evento de fusión es seguido de un evento de fisión (*Figura 1.2*). En mamíferos se han descrito al menos tres GTPasas localizadas en la mitocondria que regulan la fusión: mitofusina 1 (Mfn1), mitofusina 2 (Mfn2), y la proteína de la atrofia óptica-1 (OPA1) (Hoppins et al., 2007). Los sitios de fisión mitocondrial se corresponden con sitios de contacto de la mitocondria con el retículo endoplásmico (ER) (Friedman et al., 2011), y la fisión esta mediada por una GTPasa citosólica, la proteína relacionada con la dinamina-1 (Drp1), que se oligomeriza formando un anillo constrictor alrededor de la membrana externa mitocondrial (Elgass et al., 2013).

Los procesos de fisión están asociados con cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{mt}$). Un evento de fisión puede generar mitocondrias asimétricas, tanto en potencial de membrana como en distribución de nucleoides. Se ha sugerido que esta

heterogeneidad es necesaria para la eliminación de mitocondrias defectuosas por mitofagia, y que es clave en la segregación de DNA mitocondrial (Twig et al., 2008; Youle and van der Bliek, 2012).

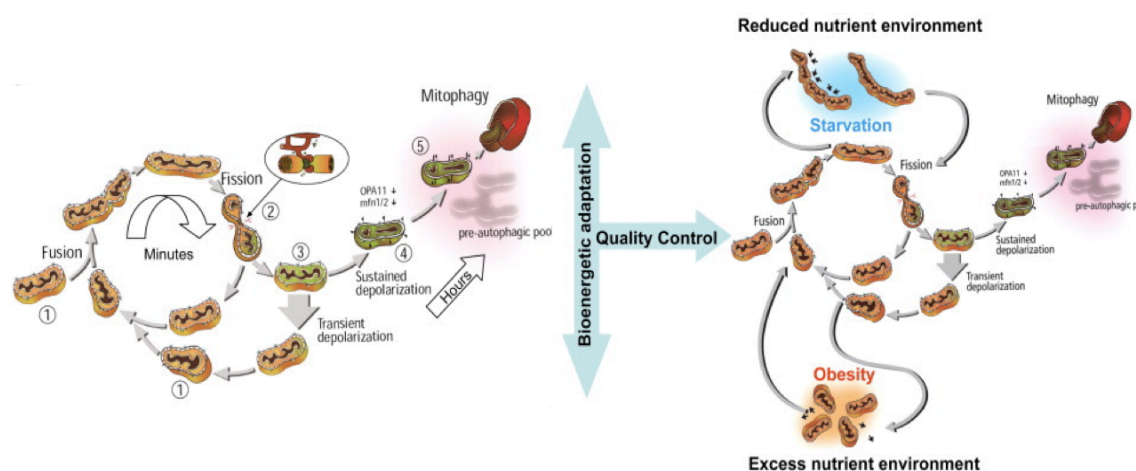


Figura I.2. El ciclo de vida mitocondrial y la regulación de la dinámica mitocondrial ante la disponibilidad de nutrientes. (A) Representación del ciclo de vida mitocondrial caracterizado por eventos de fusión-fisión. (B) Cambios en la disponibilidad de nutrientes y en la demanda energética pueden modificar el ciclo de vida mitocondrial, incrementando la estancia de la mitocondria en el estado de post fusión (elongación) o en el estado de post fisión (fragmentación). *Figura tomada de (Liesa M and Shirihai OS, 2013).*

Otros estudios en el campo de la dinámica mitocondrial han identificado un interesante vínculo en el equilibrio entre la demanda y el suministro energético y la arquitectura mitocondrial. Las células que están expuestas a un ambiente rico en nutrientes tienden a tener sus mitocondrias en un estado fragmentado, y las sometidas a ayuno tienden a estar más tiempo en el estado conectado (alargadas) (Gomes et al., 2011; Molina et al., 2009) (Figura I.2). Además, estudios recientes apuntan a diferencias en la capacidad metabólica, producción de ROS y capacidad de inducir apoptosis entre las mitocondrias fragmentadas y las alargadas (Picard et al 2013), lo cual implica que la adaptación bioenergética requiere una remodelación de la arquitectura mitocondrial (Cogliati et al., 2013). Estas observaciones han conducido al estudio de la relevancia de la dinámica mitocondrial específica de tejido, ya que la adaptación de la eficiencia bioenergética y de la capacidad de síntesis de ATP, ante la disponibilidad de nutrientes, difiere entre tejidos y esta íntimamente ligada a su fisiología específica (Liesa and Shirihai, 2013).

II. La mitocondria: un orgánulo versátil

II.1 Diversidad funcional: Divergencia de rutas metabólicas

Desde una perspectiva funcional, el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) es único, ya que en la misma estructura se desempeñan tres procesos asociados:

El primero es la transferencia de electrones desde los equivalentes reducidos al oxígeno, a través de reacciones redox llevadas a cabo por los diferentes aceptores de electrones, algunos localizados en los mismos complejos respiratorios (Complejos I a IV) y otros, la CoQ y el Citocromo c, entre complejos. En cualquier caso, el aceptor final de electrones es el oxígeno molecular, que puede ser reducido o bien por dos electrones formando H_2O en el complejo IV (CIV), o bien por tan solo por un electrón generando el anión superóxido (O_2^-), principalmente en los complejos I (CI) y III (CIII). Este superóxido puede ser transformado a H_2O_2 y a radical hidroxilo (OH^\cdot), todas estas son moléculas muy reactivas que colectivamente se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Murphy, 2009). El segundo proceso es el bombeo de protones que tiene lugar en tres sitios específicos del CI, CIII y CIV, y que utiliza la energía liberada en la transferencia de electrones para generar un gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial. El tercer proceso es la síntesis de ATP, llevada a cabo por la H^+ -ATP Sintasa (CV) que hace uso del gradiente de protones (MITCHELL, 1961; Okuno et al., 2011).

Estos tres procesos son esenciales para la producción de energía, pero cada uno de ellos puede ser usado para propósitos adicionales. De este modo, el gradiente de protones puede ser usado para generar calor en lugar de ATP (i.e. tejido adiposo marrón (Enerbäck et al., 1997)) o para acoplar el transporte de solutos, iones, metabolitos y proteínas a través de la membrana interna mitocondrial (Neupert and Herrmann, 2007). El bombeo de protones también participa en procesos celulares más generales, por ejemplo, la enzima nucleótido transhidrogenasa (Nnt) depende de éste para generar NADPH mitocondrial, necesario para mantener la homeostasis de ROS (Mannella et al., 2013). En última instancia el bombeo de protones también puede llegar a desencadenar la cascada de señalización de apoptosis celular.

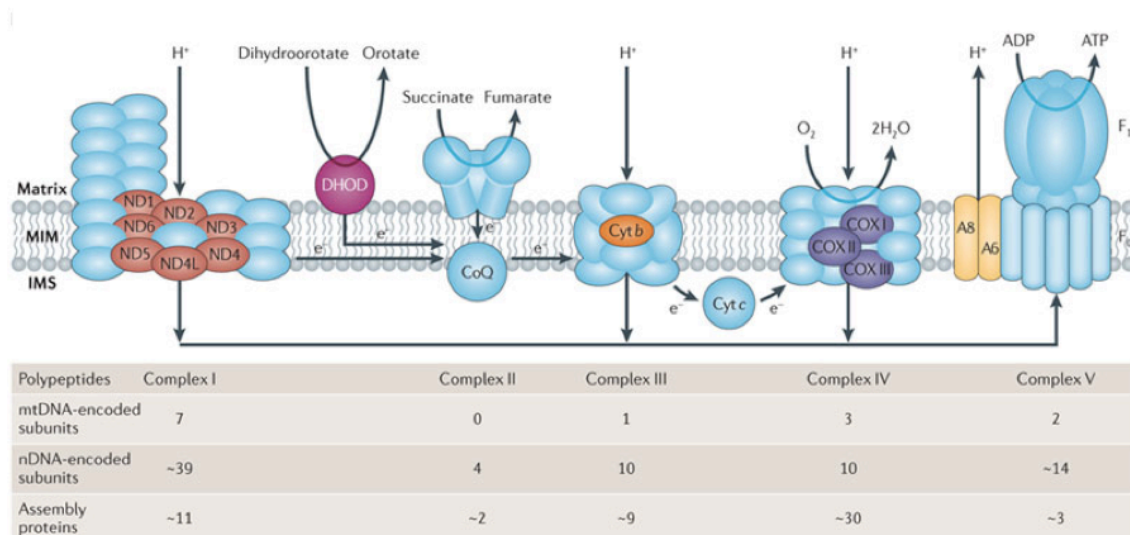


Figura I.3: Sistema de Fosforilación Oxidativa (OXPHOS). El sistema OXPHOS consta de una cadena de transporte electrónico (mtETC), formada por los complejos I-IV y dos transportadores de electrones móviles (CoQ y Cyt c), y una ATP sintasa o complejo V. Aunque la mayor parte de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en el núcleo celular, el mtDNA contiene información para 37 genes: 13 proteínas, que forman parte de la cadena de transporte electrónico y 24 RNAs necesarios para su síntesis (2 RNAs ribosómicos y 22 tRNAs). De los 13 polipéptidos, 7 forman parte del CI (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6), 1 corresponde al apocitocromo b del CIII (CYTB), 3 subunidades del CIV (COI, COII y COIII), y 2 son las subunidades 6 y 8 de la ATPasa o CV (ATP6 y ATP8).

Los electrones procedentes del $\text{NADH} + \text{H}^+$ pasan secuencialmente a través del CI, la CoQ, el CIII y el citocromo c, para llegar finalmente a CIV, quien los cederá al oxígeno molecular generando H_2O . De forma alternativa, los electrones del FADH_2 , producto final de la succinato deshidrogenasa, la ETF-ubiquinona reductasa o la dihidroorotato deshidrogenasa, son cedidos a través del CII al CoQ y son canalizados mediante el CIII, citocromo c y CIV para finalmente reducir el oxígeno molecular.

En los Complejos I, III y IV el flujo electrónico está acoplado a un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana. De esta manera se genera un gradiente electroquímico o potencial de membrana que es aprovechado por la ATP sintasa o Complejo V para llevar a cabo la síntesis de ATP a partir del ADP y Pi, completándose el proceso de fosforilación oxidativa.

Imagen tomada de (Schon EA et al., 2012)

Por otro lado, el sistema OXPHOS está íntimamente ligado con numerosos procesos metabólicos, como son el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de pirimidinas, metabolismo de aminoácidos, síntesis del grupo hemo y centros de Fe-S (Lill et al., 2012), homeostasis del Ca^{2+} (Baughman et al., 2011), la regulación del proceso apoptótico (Wasilewski and Scorrano, 2009) o el importe de precursores mitocondriales. Teniendo en cuenta la cantidad de funciones interconectadas que tienen lugar en la mitocondria, muchos autores la han descrito como el principal centro metabólico celular. Este hecho le confiere a la mitocondria un papel fundamental en la definición de la capacidad de la célula para adaptarse a los diferentes requerimientos determinados por la función del tejido y el ambiente. Aunque las unidades metabólicas sean las mismas en todos los tipos celulares (i.e. ATP, AcCoA, NADH, NADPH), en la mitocondria tienen lugar una gran cantidad de rutas metabólicas específicas de

tejido. Por ejemplo, tenemos la síntesis de la urea en el hígado, la gluconeogénesis en el hígado y riñón, la síntesis de hormonas esteroideas en corteza adrenal o la regulación de la termogénesis por UCP1 en el tejido adiposo marrón. Todo ello implica que las mitocondrias de los distintos órganos presentan especialización tanto en las diferentes rutas metabólicas para el uso de los combustibles disponibles como en sus diferentes capacidades biosintéticas (García et al., 2005; Khairallah et al., 2004; Merritt et al., 2011; Wang et al., 2011). Así por ejemplo, las mitocondrias del músculo esquelético son capaces de oxidar ácidos grasos, mientras que las de neuronas son capaces de oxidar cetonas.

II.2 Diversidad estructural: Formación de supercomplejos y versatilidad

La organización del sistema de fosforilación oxidativa dentro de la membrana interna mitocondrial ha resultado ser mucho más complicada de lo que se suponía inicialmente. Tradicionalmente se propusieron dos modelos: el “modelo fluido” (Hackenbrock et al., 1986) que postula que los complejos de la cadena difunden libremente por la membrana y la transferencia de electrones tiene lugar en función de las colisiones arbitrarias entre los complejos y los transportadores móviles; y el “modelo sólido” (CHANCE and WILLIAMS, 1955) que propone la asociación entre los complejos I-IV siguiendo una secuencia ordenada. Nuestro grupo ha propuesto un tercer modelo, “modelo de plasticidad”, en el que los complejos pueden aparecer individualmente o bien establecer diversas asociaciones entre ellos formando diferentes tipos de supercomplejos (Acín-Pérez et al., 2008). El “modelo de plasticidad” ha sido consolidado tras la identificación de las proteínas Rcf1 y Rcf2 en levaduras (Strogolova et al., 2012), y SCAFI en mamíferos (COX7A2L) (Lapuente-Brun et al., 2013). Éstas son las primeras proteínas descritas en la asociación de supercomplejos (SC), poniendo de manifiesto que los complejos respiratorios individuales se ensamblan entre sí formando SC *in vivo*, que el proceso de construcción de SC requiere factores específicos y, por tanto, que pueden existir mecanismos regulatorios genéticos en su formación. (*Figura I.4*)

Desde un punto de vista funcional, se ha propuesto que la existencia de supercomplejos teóricamente confiere varias ventajas, entre ellas la canalización más eficiente de los electrones a través de las moléculas transportadoras, la disminución en la producción de ROS, o la estabilización de los complejos para su correcto ensamblaje (Acín-Pérez and Enriquez, 2014; Genova and Lenaz, 2014). Experimentalmente, se ha demostrado que la formación de supercomplejos juega un papel fundamental en la utilización de los diferentes equivalentes reducidos en la cadena respiratoria, y que el ensamblaje dinámico de supercomplejos es un mecanismo que permite a las células adaptarse a las diferentes fuentes de carbono y construir una cadena de transporte de electrones específica de acuerdo a los requerimientos celulares.

Estudios recientes de nuestro grupo demuestran que la formación de supercomplejos define pools específicos de CIII, CIV, CoQ y cyt c para recibir los electrones derivados de NADH o FADH₂ (Lapiente-Brun et al., 2013).

Recientemente también se ha demostrado que la forma de las crestas mitocondriales regula la estabilidad y ensamblaje de los SCs respiratorios, lo cual tiene un impacto en la eficiencia respiratoria y crecimiento celular (Cogliati et al., 2013). La versatilidad en la formación de SCs es crítica en la adaptación celular a los diferentes nutrientes, ya que la proporción relativa de electrones suministrados vía NADH y FADH₂ depende del nutriente utilizado; por ejemplo, el metabolismo oxidativo de una molécula de glucosa genera 10 electrones vía NADH y 2 vía FADH₂, obteniendo un ratio NADH/FADH₂ de 5; mientras que para un ácido graso típico como el palmitato este ratio es de 2.

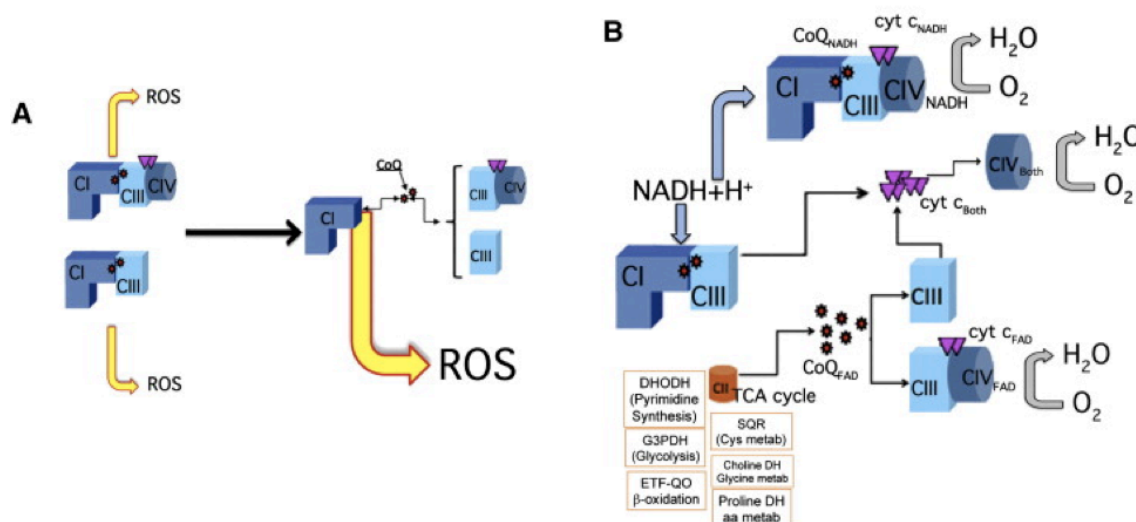


Figura I.4: Funciones de la organización en supercomplejos para las que existen evidencias.

(A) Ilustración esquemática mostrando un incremento en la producción de ROS en presencia de CI y CIII disociados frente al SC I+III ó I+III+IV. (B) Esquema del modelo de plasticidad de la mETC. La asociación de los CI y III determina dos poblaciones de CoQ diferentes, en función de si esta recibe los electrones desde el CI contenido en el SC I+III (CoQ_{NADH}) o desde otras enzimas reductoras de CoQ, como el CII (CoQ_{FADH}). La asociación de los CIII y CIV determina diferentes poblaciones de Cyt C en función de si éste aporta los electrones al CIV libre, al SC III+IV o al CIV contenido en el respirosoma. (Acín-Perez R. and Enriquez JA, 2014).

II.3 Diversidad en la señalización: sensores y mecanismos mitocondriales para regular el metabolismo.

Puesto que las necesidades metabólicas pueden fluctuar en el orden de segundos o perdurar por tiempos mucho mas largos, ninguna molécula o sistema estático puede por si solo ser efectivo en el control del flujo permitiendo una adaptación eficaz a cada situación.

Por ello, son muchos los componentes moleculares encargados de reconocer y transducir el estatus metabólico mitocondrial. Éstos incluyen factores de transcripción, hormonas, cofactores, receptores nucleares y quinasas que regulan la función metabólica mediante: (i) el control de los procesos de transcripción, *splicing*, estabilidad y traducción en la síntesis de determinadas proteínas, (ii) modificaciones post-traduccionales (Dominy et al., 2011), o (iii) efectos alostéricos en determinadas enzimas. Pero en última instancia, estos factores detectan señales de la actividad mitocondrial como son los intermediarios metabólicos (la ratio NAD^+/NADH , AMP/ATP , ADP/ATP o los niveles de acetyl-CoA), los niveles de ROS, o el potencial de membrana mitocondrial (Jin et al., 2010).

En primer lugar, para mantener una correcta homeostasis celular se debe mantener un balance entre la generación y el consumo de ATP, por ello es lógico que existan proteínas regulatorias capaces de detectar los niveles de ATP, ADP y AMP. Sin embargo, tan sólo unas pocas enzimas son capaces de percibir directamente variaciones en la ratio de AMP/ATP , como son la glucógeno fosforilasa, la fosfofructokinasa o la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Por ello, se considera que la kinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) es el principal sensor energético celular, y por tanto, clave en el mantenimiento de la homeostasis energética (Hardie et al., 2012). Brevemente, cuando la AMPK es activada tras un estrés energético, ya sea por una situación de reducción en el aporte calórico o bien ante un aumento en el gasto energético, se estimularán rutas catabólicas y se inhibirán las anabólicas, a través de la fosforilación de varias dianas. Las rutas clásicas por las cuales AMPK es activada son bien por un aumento en el ratio AMP/ATP o ADP/ATP , o bien por un incremento de Ca^{2+} . En los últimos años se ha propuesto que AMPK también puede ser activada por los ROS (Wu et al., 2013). Mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina de varias dianas, la AMPK es capaz de estimular la captación celular de glucosa y/o de ácidos grasos, para después promover el catabolismo de la glucosa vía glucólisis y/o de los ácidos grasos mediante la β -oxidación que tiene lugar en la mitocondria. Otra manera que tiene la AMPK para incrementar la capacidad oxidativa es mediante la activación de la biogénesis mitocondrial a través de la fosforilación (Jäger et al., 2007) o acetilación (Cantó et al., 2009) de $\text{PGC1}\alpha$, o mediante el reemplazo mitocondrial a través de la activación de la mitofagia (Egan et al., 2011). En este último caso, se presupone que como las mitocondrias son particularmente susceptibles al daño oxidativo, la mitofagia puede ser un

mecanismo por el cual se renueven las mitocondrias dañadas, permitiendo así mantener una producción de ATP óptima.

El metabolismo mitocondrial también está íntimamente ligado con la coenzima NAD; así, la disponibilidad y estado redox de la NAD tienen una gran influencia en muchos de los procesos metabólicos mitocondriales (Dölle et al., 2013). La principal actividad de la NAD en la mitocondria tiene lugar en las reacciones redox. Muy concisamente, la forma oxidada (NAD^+) es reducida a NADH en reacciones catabólicas como las que tienen lugar en el ciclo de Krebs o en la β -oxidación de ácidos grasos, mientras que la forma reducida (NADH) actúa como agente reductor, siendo oxidada de nuevo por el Complejo I durante la fosforilación oxidativa. Así que la proporción NAD^+/NADH es un importante señalizador del estado redox y energético mitocondrial.

Como molécula señalizadora, el NAD participa en modificaciones postraduccionales de proteínas como la ADP-ribosilación (i.e la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH)) (Ueda and Hayaishi, 1985), y en la generación de segundos mensajeros (i.e ADPR cíclico) participando en la señalización del Ca^{2+} (Clapper et al., 1987). Pero sin lugar a dudas, es su papel en la deacetilación por sirtuinas el que centra la mayoría de las miradas en los últimos años.

Desde que se descubrieron en el año 2000 (Kaeberlein et al., 1999), las sirtuinas (Sirt) son consideradas uno de los principales sensores metabólicos celulares. Son deacetilasas de histonas sensibles al estado metabólico, ya que requieren NAD^+ como cofactor y, por ejemplo, tras un periodo de ayuno o ejercicio la ratio NAD^+/NADH se incrementa y por lo tanto se estimula la deacetilación mediada por sirtuinas (Houtkooper et al., 2012).

En los últimos años se suceden los estudios que relacionan la actividad de las sirtuinas con el envejecimiento y la longevidad (Hall et al., 2013). Se ha abierto un nuevo campo de investigación desde que se describió que Sir2 (sirtuina de levaduras homóloga a Sirt1) estaba involucrada en la regulación de la longevidad por medio de la restricción calórica (Houtkooper et al., 2010). La sobreexpresión de Sirt1 (Boutant and Cantó, 2014; Herranz et al., 2010; Satoh et al., 2013) o la suplementación farmacológica de NAD^+ (NR o NMN) (Cantó et al., 2012) reproducen muchos de los beneficios obtenidos con la restricción calórica, como son la protección frente a disfunciones metabólicas asociadas con la edad, enfermedades cardiovasculares, cáncer y neurodegeneración; incluso mejoran la función mitocondrial (Khan et al. 2014 *en prensa*).

II.3.1 Especies reactivas de oxígeno como señalizadoras

Como la mitocondria es una de las mayores fuentes de producción de ROS, se considera crítica en la regulación de la señalización redox. La señalización redox es un modo de señalización en la cual la producción de ROS o cambios en el estado redox de parejas como el glutatión o las tiorredoxinas provocan cambios en la actividad de proteínas como por ejemplo factores de transcripción. De este modo, el H_2O_2 puede difundir a través de la mitocondria y modificar reversiblemente residuos de cisteínas que provocarán cambios en la actividad de las proteínas, que podrán ser revertidos por los pools de glutatión y tiorredoxinas una vez que la señal disminuya (Lenaz, 2011).

La generación de ROS en la matriz mitocondrial va a depender principalmente de la fuerza protón-motriz y gradiente electroquímico, de las ratio $NADH/NAD^+$, $CoQH_2/CoQ$, y de la concentración local de O_2 (Murphy, 2009). Ello hace pensar que los niveles de ROS pueden ser un buen indicador del estatus metabólico celular.

Cada vez toma más fuerza la idea de que los ROS actúan como moléculas señalizadoras en puntos específicos de numerosas cascadas de transducción (Formentini et al., 2012; Hamanaka and Chandel, 2010; Owusu-Ansah and Banerjee, 2009; Raimundo et al., 2012), como en la inducción de la biogénesis mitocondrial, respuesta ante situaciones de hipoxia, señalización en la diferenciación celular o regulación de la actividad de los complejos respiratorios (*Figura I.5*).

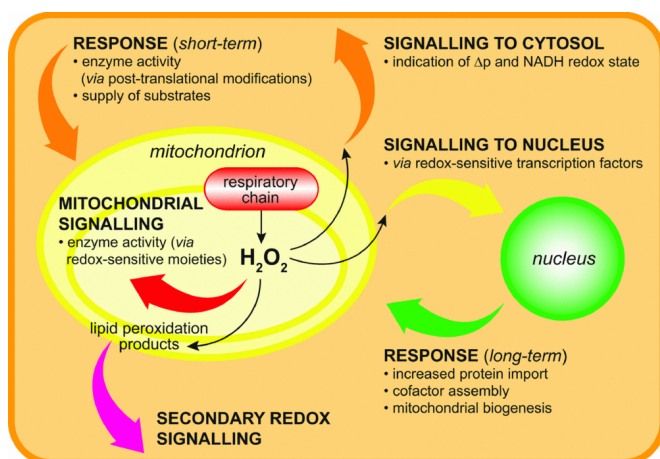


Figura I.5: Posibles mecanismos de señalización redox mitocondriales.
Imagen tomada de (Murphy MP, 2009)

Se propone que los ROS pueden actuar como moléculas señalizadoras induciendo la biogénesis mitocondrial (Moreno-Loshuertos et al., 2006), siendo este un mecanismo compensatorio ante defectos en la cadena respiratoria o adaptativo ante situaciones de estrés. Los ROS están involucrados en la señalización de AKT, una importante enzima reguladora de la biogénesis mitocondrial. Se propone que el peróxido de hidrógeno, a través de modificaciones redox, inactiva PTEN, por lo tanto se promueve la fosforilación de AKT y como consecuencia

se induce la biogénesis mitocondrial (Cruz et al., 2007; Li et al., 2013). También se ha propuesto que los ROS pueden inducir biogénesis mitocondrial vía PGC1 α (St-Pierre et al., 2006). En levaduras, los ROS han sido asociados directamente con la biogénesis mitocondrial mediante la oxidación de NTG1, necesaria para el inicio de la replicación del mtDNA (Hori et al., 2009).

La señalización redox parece ser crítica también en la respuesta a hipoxia. Así, se ha sugerido, que en situaciones de hipoxia las mitocondrias se localizan perinuclearmente para incrementar los niveles de ROS localmente en el núcleo e incrementar la transcripción de genes HIF-1 α dependientes (Al-Mehdi et al., 2012).

Los ROS también están involucrados en la diferenciación celular, se ha descrito que son críticos en la diferenciación de adipocitos (Tormos et al., 2011); o en la activación de las células T (Sena et al., 2013). Pero también, los ROS y la función mitocondrial son críticos en el mantenimiento de la condición de pluripotencia (Ahlqvist et al., 2012; Sánchez-Aragó et al., 2013), ya que los ROS producidos durante el metabolismo mitocondrial pueden determinar el destino de las células madre hematopoyéticas (HCS) (Suda et al., 2011) (Ito et al., 2004; 2006; Jang and Sharkis, 2007). Las HSC quiescentes tienen mecanismos protectores para prevenir altos niveles de ROS, como son menor contenido mitocondrial, metabolismo glucolítico, o una defensa antioxidante reforzada. Pequeños cambios en el contenido de ROS, pueden estimular estas células promoviendo la proliferación o diferenciación y reduciendo la capacidad de auto-renovación.

Como último ejemplo, hay que destacar el papel de los ROS en la regulación de la cadena de transporte de electrones permitiendo su adaptación para el uso de diferentes combustibles. Así, el peróxido de hidrógeno participa en la activación de la Fgr, una tirosina quinasa, que fosforila la subunidad catalítica FpSDH del Complejo II. Esta activación induce el Transporte Reverso de Electrones, ajustando los niveles de Complejo I y así se optimiza el uso de NADH/FADH₂ (Acin-Perez et. al. 2014, en prensa; Guaras-Rubio et al. 2014, *en prensa*).

II.3.2 Mitohormesis

En los últimos años se ha desarrollado el concepto de hormesis mitocondrial (mitohormesis). Este postula que niveles moderados de diferentes tipos de estrés mitocondrial inducen una respuesta adaptativa haciendo a las células menos susceptibles a posteriores perturbaciones. Se ha originado una nueva área de investigación centrada en la caracterización de los mecanismos moleculares de estas respuestas protectoras, y en evaluar su alcance en trastornos metabólicos y en última instancia en el envejecimiento (Yun and Finkel, 2014).

Se ha descrito que existe un aumento significativo de la longevidad en varios organismos si se afecta levemente la función mitocondrial. Por ejemplo mediante la reducción de algunas proteínas mitocondriales en *C. elegans* (Hamilton et al., 2005) y *Drosophila* (Copeland et al., 2009), o la supresión del factor de ensamblaje SURF1 en ratones (Dell'agnello et al., 2007). Estos resultados sugieren que perturbaciones leves impiden el deterioro de la función mitocondrial asociada a la edad, incluso se ha propuesto que el desequilibrio entre proteínas nucleares y mitocondriales puede ser un mecanismo conservado de la longevidad (Houtkooper et al., 2013).

Como posibles señalizadores del estrés mitocondrial en el fenómeno de mitohormesis, se han propuesto los niveles de ROS (Yang and Hekimi, 2010) y de NAD⁺ (Gomes et al., 2013; Mouchiroud et al., 2013). De este modo, se ha observado que un aumento en el estrés oxidativo (Ristow and Schmeisser, 2011; Zuin et al., 2010), o la administración de un precursor del NAD⁺ (NR o NMN) (Cantó et al., 2012) pueden aumentar la longevidad.

Por medio de la respuesta mitocondrial a proteínas desplegadas (*mitochondrial unfolding protein response* o UPRmt) la células pueden responder al estrés mitocondrial, tratando de restaurar la homeostasis mediante la inducción de la transcripción de chaperonas y proteasas mitocondriales, como también mediante la inducción de genes involucrados en el importe de proteínas mitocondriales y en el metabolismo de ROS (Jovaisaite et al., 2014). Parece ser, que tan sólo forzando la expresión de los genes que regulan la UPRmt es suficiente para retardar el deterioro de la función mitocondrial con la edad. Es muy interesante que en un modelo de *Drosophila* con una disfunción mitocondrial en el músculo, se ha descrito una inducción autónoma de la UPRmt complementada a su vez con la represión no autónoma de la señalización de la insulina, promoviendo la longevidad y retrasando el deterioro de la función muscular con la edad (Owusu-Ansah et al., 2013).

III. La mitocondria: un orgánulo sinérgico

III.1 Sinergia de dos genomas: nuclear y mitocondrial

La singularidad genética del sistema OXPHOS es que es el único proceso descrito en células de mamíferos cuyos componentes están codificados en dos genomas, el DNA mitocondrial (mtDNA) y el DNA nuclear (nDNA) (*Figura I.3*).

En gran medida esta sinergia de genomas es la responsable de la complejidad del sistema. Así, la función sinérgica del sistema OXPHOS va a depender de: (i) las características intrínsecas de ambos genomas; (ii) la acción coordinada y cooperativa de los dos genomas, siendo necesaria una comunicación funcional entre el núcleo y la mitocondria para formar una correcta estequiometría de los complejos OXPHOS; (iii) y del desajuste o “*mismatch*” que se pueda dar entre los productos génicos codificados en ambos genomas (Lane, 2011).

III.1.1 Características del genoma mitocondrial

Ambos genomas, nuclear y mitocondrial, presentan importantes diferencias tanto a nivel de estructura, función, herencia y ploidía (*Tabla I.1*).

Característica	Genoma Nuclear	Genoma Mitocondrial
Tamaño	~ 3.3x10 ⁹ bp	16.569 bp
Numero de moléculas de DNA por célula	23 haploides, 46 diploides	Poliploidía, varios miles de copia por célula
Número de genes codificados	~ 20.000-30.000	37
Densidad Génica	~ 1 por 40.000 bp	1 por 450 bp
Intrones	Frecuentes	Ausentes
Porcentaje de DNA codificado	~ 3%	~ 93%
Código genético	Universal	AUA: metionina; TGA triptófano; AGA y AGG codones stop
Asociaciones con proteicas	Nucleosoma, histonas	Nucleoides, TFAM
Modo de herencia	Mendeliana para autosomas y Cr. X. Paternal para el Cr. Y	Exclusivamente materna
Replicación	Coordinada con el ciclo celular. DNA polimerasas α y δ	Relajada. Independiente del ciclo celular. DNA polimerasa γ
Transcripción	Muchos genes se transcriben individualmente	Todos los genes de ambas cadenas se transcriben como policistrones
Recombinación	Durante la profase de la meiosis	No hay evidencias

Tabla I.1: Principales diferencias entre el genoma nuclear y mitocondrial. Tabla modificada de (Taylor RW and Turnbull DG, 2005)

Las diferencias más relevantes son la herencia materna (Giles et al., 1980) y la condición de multicopia del mtDNA. En mamíferos, cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de mtDNA y cada célula, alrededor de 10^3 y 10^4 copias, dependiendo del tejido y de las necesidades energéticas de la célula (Satoh and Kuroiwa, 1991). Además es posible la existencia de varias formas alélicas del mtDNA en un mismo individuo, pudiendo diferir su proporción relativa dependiendo del tejido (Holt et al., 1988a). La presencia de más de un tipo de mtDNA en una célula o tejido se denomina heteroplasmia, frente al término homoplasmia que se utiliza cuando todas las moléculas de mtDNA de una célula u organismo son idénticas. Dentro de un individuo pueden encontrarse distintos grados de heteroplasmia en los diferentes tejidos.

Cabe destacar también que el mtDNA no sufre recombinación (Hagström et al., 2014); aunque presenta una alta tasa de mutación (10 veces superior a la del nDNA) (Brown et al., 1979). Esta se ha atribuido a la exposición del mtDNA a las especies reactivas de oxígeno generadas en el interior de las mitocondrias y a la ausencia de sistemas eficientes para su reparación. Pero recientemente se ha postulado que la mayor tasa de mutación del mtDNA puede haber sido seleccionada positivamente al conferirle un carácter similar a los genes de contingencia (Parmakelis et al., 2013) (*Comunicación Oral, José Antonio Enríquez*).

III.1.2 Expresión coordinada de dos genomas, biogénesis mitocondrial y control de calidad.

El sistema OXPHOS es el resultado de la acción coordinada de los dos genomas, nuclear y mitocondrial, y aunque la síntesis de las proteínas mitocondriales tiene lugar en dos compartimentos celulares, la regulación coordinada de la biogénesis mitocondrial está gobernada por factores nucleares jerárquicamente regulados (Dominy and Puigserver, 2013).

Todos los factores que se requieren para el mantenimiento y transcripción del mtDNA están codificados en el núcleo. De esta manera, la transcripción del mtDNA está regulada principalmente por los factores de transcripción mitocondrial A (TFAM), B1 (TFB1) y B2 (TFB2) y la RNA polimerasa- γ (Polrmt), y por los factores de transcripción que controlan la expresión de genes respiratorios codificados por el núcleo, NRF1 y NRF2, que controlan la expresión de genes OXPHOS (Cyt c, ATPase- γ o subunidades del complejo IV). Además, estos factores de transcripción nucleares, NRF1 y NRF2, también regulan la expresión de genes de proteínas de importe mitocondrial, de ensamblaje, y de factores de transcripción mitocondriales como TFAM, TFB2 y TFB1 (Gleyzer et al., 2005), de manera que podrían coordinar la expresión simultánea de los dos genomas (Bestwick and Shadel, 2013).

Se ha descrito un nivel superior de coordinación, sujeto al control de co-activadores de la transcripción de la familia de los receptores activados por factores proliferadores de peroxisomas (PPARs) como son PGC1- α , PGC1- β y PRC (Puigserver et al., 1999; Scarpulla, 2006). El más estudiado es PGC1 α , que es capaz de regular la biogénesis mitocondrial a través de su interacción con los factores nucleares NRF1 y NRF2, con el receptor nuclear relacionado con el receptor de estrógenos α (ERR- α) (Tcherepanova et al., 2000), e incrementando la expresión de TFAM, TFB1 y TFB2. Como hemos visto en el apartado anterior, la activación de PGC1 α puede estar mediada por AMPK o Sirt1 en situaciones de restricción calórica (Cantó et al., 2009), y por los ROS o por HIF1 α en situaciones de hipoxia (Wenz, 2013).

Así, se considera que la modulación de la biogénesis mitocondrial es un mecanismo de adaptación que permite mantener la homeostasis celular ya sea en procesos fisiológicos, como el desarrollo y diferenciación celular, programas celulares y tisulares específicos, o ante situaciones de estrés.

Aunque PGC1 α es considerado el regulador central de la biogénesis mitocondrial, deben existir más mecanismos regulatorios alternativos ya que, por ejemplo, la ablación de PGC1 α no perjudica la proliferación celular durante el desarrollo embrionario o la formación de las células germinales femeninas; y en ambos casos la biogénesis mitocondrial está severamente regulada. Sin embargo, se sabe muy poco sobre estos mecanismos alternativos (Lin et al., 2004; Selesniemi et al., 2011).

Por último, el doble origen genético del sistema de fosforilación oxidativa, exige la existencia de varios sistemas que ejerzan un fuerte control y permitan eliminar aquellos productos proteicos que se hallen en exceso o sean defectuosos (Gerdes et al., 2012). La mitocondria dispone de un sistema proteolítico compuesto por i-AAA (activas en el espacio intermembrana) y m-AAA proteasas (activas en la matriz mitocondrial) que además de promover la degradación de las proteínas defectuosas, participan en la maduración proteolítica de proteínas específicas, como la proteína MrpL32, regulando así la biogénesis de la cadena respiratoria (Nolden et al., 2005). Además, la mitocondria dispone de un mecanismo de respuesta a proteínas desplegadas específico (UPRmt), que se inducirá ante un estrés mitocondrial induciendo la transcripción de chaperonas (i.e HSP-70 y HSP-60) para restablecer la proteostasis mitocondrial (Jovaisaite et al., 2014).

III.1.3 Interacción de proteínas nucleares y mitocondriales

Las subunidades codificadas por los genes mitocondriales tienen que interactuar directamente con las subunidades codificadas en el núcleo, confiriendo al sistema OXPHOS un

característica de mosaico o puzle, cuya función estará determinada por el resultado de la interacción de las piezas del mismo (*Figura I.3*).

La importancia funcional de esta interacción se ve reflejada en la co-evolución que han sufrido ambos genomas, puesta en evidencia por el hecho de que la función del sistema OXPHOS se pierde cuando se combinan nDNA y mtDNA de especies cercanas (Hadjivasiliou et al., 2012).

Aunque la mayoría de las subunidades de los complejos respiratorios sean comunes a todos los órganos, en mamíferos se ha confirmado la expresión de variantes específicas de tejido. Por lo menos cinco subunidades del complejo IV presentan isoformas específicas de tejido. Estas son Cox4i1/Cox4i2; Cox6a1 y Cox6a2; Cox6b1/Cox6b2; Cox7a1/Cox7a2; Cox8a/Cox8b/Cox8c (Fornuskova et al., 2010), así por ejemplo, la Cox7a1 es una isoforma del corazón y músculo, mientras que Cox7a2 es una isoforma del hígado. Pero además, la expresión de estas isoformas capaces de conferir diferentes propiedades catalíticas, no solamente son específicas de tejido, si no que también se pueden expresar ante ciertos estímulos. Por ejemplo, ante situaciones de hipoxia se induce un reemplazamiento de la isoforma Cox4i1 por la Cox4i2, otorgando una mayor ratio de reemplazo a la actividad de la enzima (Fukuda et al., 2007). En otras especies, como *Drosophila*, se ha observado que presentan duplicaciones de genes mitocondriales codificados en el núcleo, y que su expresión es tejido específica (Gallach et al., 2010).

La homoplasmia, situación en la cual todas las copias de mtDNA son idénticas en una célula, es considerada la norma biológica (en ausencia de patología), sin embargo las nuevas aproximaciones metodológicas utilizando secuenciación de nueva generación, indican que la heteroplasmia en humanos es más común de lo que se pensaba (Ramos et al., 2013).

Ante estos antecedentes, se ha propuesto que la existencia de distintas combinaciones nucleares (i.e duplicaciones génicas, isoformas, variantes poblacionales...) y mitocondriales (i.e variantes de mtDNA, heteroplasmia...) es otro proceso que puede conferir versatilidad a la cadena respiratoria.

III.2 Variabilidad poblacional del mtDNA

El mtDNA es altamente polimórfico: esto significa que hay numerosas diferencias en su secuencia, no patológicas, entre individuos del mismo grupo étnico y que se ven incrementadas entre individuos de grupos distintos. Estudios de fragmentos polimórficos de restricción (RFLP) del mtDNA de un amplio rango de poblaciones humanas, han puesto de manifiesto la existencia

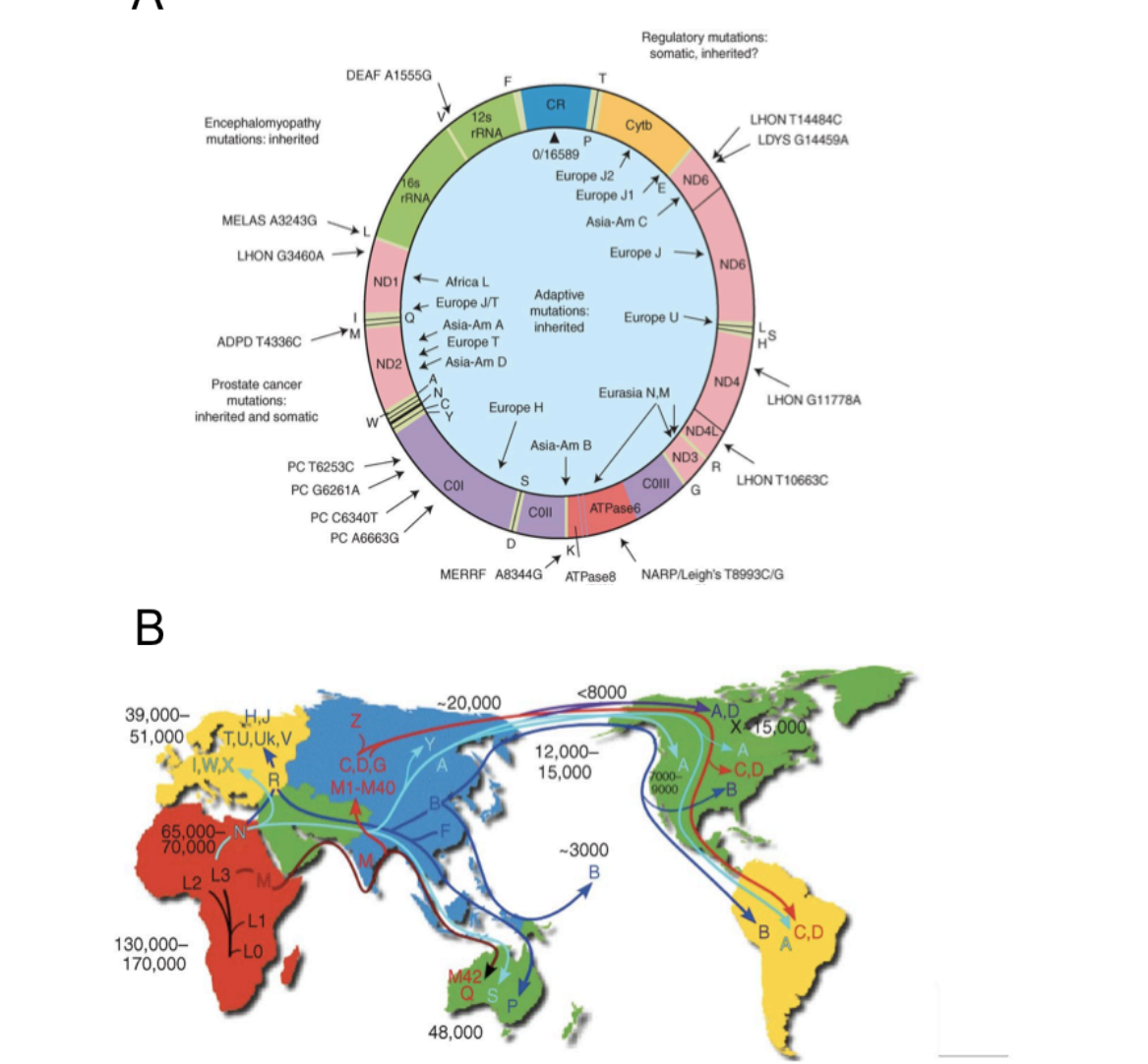


Figura 1.6: Varaiabilidad pobacional y mutaciones del mtDNA. (A) Mapa del mtDNA humano mostrando las sustituciones de bases patológicas (periferia) y adaptativas (centro). (B) Diagrama de la historia migratoria de los haplogrupos de mtDNA humanos. Figura tomada de *Wallace DC. and Chalkia D., 2013*.

La extensa variabilidad de secuencia que presenta el mtDNA humano se ha considerado durante algún tiempo como el resultado de sustituciones neutras que se han ido acumulando a lo largo de la historia de las mujeres en lugares geográficos discretos y a causa de la deriva genética. Es decir, se ha considerado que esta variabilidad no patológica en el mtDNA se ha acumulado bajo un modelo de equilibrio neutro, fuera de la selección, y con poca o ninguna relevancia como un mediador de los procesos evolutivos de la población. Así, la ausencia de selección, la herencia materna y la falta de recombinación del mtDNA, han hecho de éste la

herramienta estrella para el estudio de la evolución y la genética de poblaciones (Pakendorf and Stoneking, 2005). (*Figura 1.6B*).

En las últimas dos décadas ha habido un importante cambio de perspectiva acerca de la neutralidad de las variantes mitocondriales. Numerosos trabajos realizados tanto en modelos de vertebrados como invertebrados, sugieren que el afianzamiento de las secuencias polimórficas del mtDNA están sujetas a importantes efectos fenotípicos (Ballard and Whitlock, 2004; Blier et al., 2001; Dowling et al., 2008; Galtier et al., 2009). Muchas de estas evidencias proceden de estudios en los cuales se han asociado variantes sanas de mtDNA con diversos fenotipos, como son la motilidad espermática y fertilidad masculina (Ruiz-Pesini et al., 2000); deficiencias auditivas (Johnson et al., 2001); cognición (Roubertoux et al., 2003); sensibilidad a fármacos (Pacheu-Grau et al., 2010); longevidad y envejecimiento (Catri et al., 2009); susceptibilidad a diversas enfermedades como alzhéimer (Ridge et al., 2012; Santoro et al., 2010), parkinson (Takasaki, 2009) o diabetes (Liou et al., 2012); penetrancia de enfermedades ligadas al mtDNA (Brown et al., 2002; Gómez-Durán et al., 2012); o a la respuesta a la sepsis (Lorente et al., 2012). También se han asociado con diferencias en funciones específicas del sistema OXPHOS, como la producción de ROS mitocondrial (Moreno-Loshuertos et al., 2006) o la cinética de ensamblaje de los complejos de la cadena de transporte electrónico (Pello et al., 2008), incluso se ha llegado a sugerir que las variaciones del mtDNA son un sistema adaptativo que han permitido la colonización de diferentes ambientes, como la adaptación a climas fríos (Ruiz-Pesini et al., 2004). Todas estas observaciones resultan todavía muy polémicas, siendo numerosos los trabajos que ponen en entredicho estas asociaciones fenotípicas, como es el caso de la motilidad espermática (Mossman et al., 2012) o del parkinson (Mehta et al., 2009).

III.3 Etiología y segregación de mutaciones patológicas del mtDNA

En 1988 se demostró que tanto delecciones en el mtDNA, mutaciones en genes codificantes de subunidades estructurales de los complejos en el mtDNA o mutaciones en los genes de la maquinaria de traducción mitocondrial, podían ocasionar enfermedades. Las delecciones se asociaron con miopatías mitocondriales (Holt et al., 1988b), se relacionó la mutación en el gen ND4 (G11778A) con la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) (Wallace et al., 1988a), y se describió que la mutación en el gen del tRNA^{Lys} (A8344G) (Shoffner et al., 1990; Wallace et al., 1988b) puede ser responsable del síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (MERRF). (*Figura 1.6A*)

Desde estas primeras asociaciones entre mutaciones del mtDNA y patología, se han descrito numerosas mutaciones puntuales, delecciones y deplecciones del mtDNA asociadas con diferentes enfermedades, siendo las mutaciones patológicas del mtDNA más comunes de lo que se

pensaba. Aunque la incidencia clínica de las enfermedades mitocondriales sea considerable, alrededor de 1:5000 (Schaefer et al., 2008), análisis de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos revela que 1 de cada 200 contiene una de las 10 mutaciones más comunes del mtDNA (Chinnery et al., 2012; Elliott et al., 2008).

La naturaleza y fenotipo de las enfermedades mitocondriales dependen principalmente de la mutación en cuestión y del porcentaje de heteroplasmia presente. De este modo, desde el punto de vista genético las enfermedades mitocondriales son muy complejas, ya que son el resultado de la interacción de numerosos genes nucleares y mitocondriales, presentando una gran variabilidad interindividual (tanto en el genoma nuclear como variantes del mtDNA) e intraindividual (función mitocondrial, expresión génica, y niveles de heteroplasmia específicos de tejido). En todo caso, el aspecto más impredecible de la genética del mtDNA sigue siendo la segregación de la heteroplasmia del mtDNA.

Es esencial tanto para entender la variabilidad clínica y etiología de muchas enfermedades mitocondriales, así como para desarrollar nuevas terapias para frenar el desarrollo y progresión de enfermedades mitocondriales (Schon et al., 2010), conocer los mecanismos por los cuales las mutaciones del mtDNA heteroplásmicas se vuelven predominantes o son eliminadas en la línea germinal femenina y/o en tejidos somáticos.

Durante los años 90, muchos grupos mostraron que las mutaciones del mtDNA podían segregar dependiendo de la mutación y del tejido. Se ha descrito una segregación direccional del mtDNA en pacientes con enfermedades mitocondriales. Por ejemplo, deleciones del mtDNA son acumuladas progresivamente en el músculo (Weber et al., 1997) y eliminadas de células sanguíneas de pacientes con el síndrome de oftalmoplejia externa progresiva crónica (CPO) y Kearns Sayre (KS) (Larsson et al., 1992); y raramente son transmitidas a través de la línea germinal femenina. Y aunque no tan rápido, la mutación en el tRNA^{Leu(UUR)} (A3243G) asociada con MELAS, también se elimina progresivamente de las células sanguíneas en los pacientes que la contienen (Pyle et al., 2007; Rahman et al., 2001) mientras que los niveles de heteroplasmia se mantienen constantes en tejidos post-mitóticos como el músculo o epitelio urinario. Sin embargo la mutación en el tRNA^{Lys} (A8344G) asociada con MERRF, no es eliminada en sangre (Rajasimha et al., 2008).

III.4 Heteroplasmia y segregación

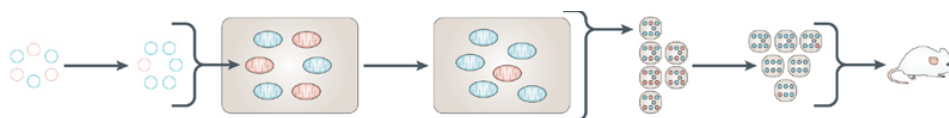
Cómo se ha visto en el apartado anterior, las mutaciones patológicas del mtDNA en humanos pueden segregar en una manera tejido-específica afectando el desarrollo y severidad de la enfermedad. Pero se sabe muy poco acerca de los mecanismos moleculares responsables de esta segregación específica (*Figura I.7*).

En sistemas de cultivo de cíbridos mitocondriales heteroplásmicos se observó que las proporciones del mtDNA mutante cambiaban a lo largo del cultivo. Se observó que había un aumento en la proporción de la mutación A3243G en cíbridos con fondo nuclear 143B (Hayashi et al., 1991). Sin embargo, la misma mutación en un fondo nuclear A549 tendía a disminuir (Yoneda et al., 1992), indicando que el fondo nuclear puede influenciar la dirección de la segregación.

Un ejemplo muy llamativo de la influencia nuclear en la segregación del mtDNA se observó en ratones en los cuales se indujo una heteroplasma artificial entre dos mtDNAs wild-type, Balb/cByJ y NZB/BINJ (Jenuth et al., 1997), en un núcleo Balb/cByJ (Sharpley et al., 2012); o 129S6 y NZB/BINJ en un núcleo C57BL/6J. Ambos modelos de ratón presentan una selección tejido-específica, que favorece la acumulación del mtDNA de NZB/BINJ en hígado y riñón, del de Balb/cByJ o 129S6 en sangre y bazo, mientras que otros tejidos no presentan preferencia por ninguna de las variantes de mtDNA. Por otra parte, se descubrió que en el núcleo CAST/Ei algunos tejidos no presentaban la misma intensidad de segregación del mtDNA Balb/cByJ y NZB/BINJ, lo que permitió mapear loci genéticos involucrados en el proceso de segregación del mtDNA (Battersby et al., 2003). Estos estudios llevaron a la identificación del gen *Gimap3* (Jokinen et al., 2010), una GTPasa del retículo endoplásmico, como un regulador crítico en la segregación del mtDNA en tejidos hematopoyéticos. Aún no se conocen los mecanismos por los cuales *Gimap3* regula la segregación del mtDNA (Jokinen and Battersby, 2013), pero este descubrimiento pone de manifiesto que los mecanismos que regulan la segregación del mtDNA pueden ser también tejido-específicos. Un trabajo realizado en nuestro grupo, sugiere que diferencias en la eficiencia de OXPHOS y en la producción de ROS entre los haplotipos de mtDNA de ratón puede ser la explicación del fenómeno de segregación selectiva observado en ratones heteroplásmicos (Moreno-Loshuertos et al., 2006).

Se ha propuesto que los mecanismos que regulan la dinámica y recambio/renovación mitocondrial pueden ser críticos en la modulación de la segregación del mtDNA. Así por ejemplo, la interferencia de los RNAs de los genes *Drp1* y *Fis1*, que promueven la fisión mitocondrial, favorece la acumulación de la mutación A3243G en células de rabdomiosarcoma heteroplásmicas humanas (Malena et al., 2009). La sobreexpresión de la ligasa ubiquitina E3 Parkina en cíbridos heteroplásmicos con una mutación deletérea en *COX1* induce una selección en contra del mtDNA mutante, y se postuló que la despolarización mitocondrial inducida por la translocación de la parkina activa la eliminación por autofagia (Suen et al., 2010). Por último, el tratamiento con rapamicina, que estimula la mitofagia por medio de la inhibición de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), induce una reducción significativa de los niveles de la mutación G11778A en líneas celulares de cíbridos heteroplásmicos (Dai et al., 2014).

Se ha demostrado también un desplazamiento en la heteroplasmia del cultivo si se ponen de manifiesto las diferencias en el rendimiento OXPHOS. El tratamiento con galactosa/Oligomicina (Manfredi et al., 1999) o con cuerpos cetónicos (Santra et al., 2004) en células que contienen una mutación en la ATP6 en heteroplasmia o en células provenientes de pacientes con deleciones en el mtDNA (síndrome KS) respectivamente, induce una eliminación del mtDNA mutante en el cultivo.



Niveles Potenciales de Selección del mtDNA	Genómico (Inter celular)	Orgánulo (Inter celular)	Celular (Intracelular)	Organismo
Posibles Mecanismos	Replicación del mtDNA	Dinámica mitocondrial: Fisión-Fusión y Mitofagia	Competición celular, Ventaja metabólica celular	Teorías evolutivas, selección y adaptación al medio

Figura I.7: Posibles mecanismos y niveles de selección del mtDNA

Figura modificada de (Stewart JB, 2009)

Otro ámbito importante en el estudio de la segregación del mtDNA es la transmisión intergeneracional (Stewart et al., 2008a). Existen notables diferencias en la segregación del mtDNA entre células germinales y somáticas. En células somáticas parece poco probable que la segregación sea causada por un cuello de botella del mtDNA, mientras que estudios intergeneracionales de la herencia del mtDNA en vacuno, ratones y familias con enfermedades mitocondriales, muestran la existencia de un rápido cambio hacia la condición de homoplasmia en tan sólo una generación (Hauswirth and Laipis, 1982; Larsson et al., 1992). Estos resultados sugieren la actuación de un cuello de botella del mtDNA en la línea germinal femenina, donde sólo unas pocas moléculas de mtDNA de la línea germinal son transmitidas para generar todas las moléculas presentes en la siguiente generación. Durante los últimos 15 años, varios estudios han intentado identificar el momento en el cual el cuello de botella genético mitocondrial tiene lugar en la línea germinal femenina (Figura I.8).

El escenario se ha complicado más, pues pese a que los primeros indicios apuntaban a que la segregación del mtDNA en la línea germinal femenina es un proceso aleatorio (Jenuth et al., 1996), estudios posteriores que testaron la segregación de mutaciones patológicas, muestran una fuerte selección purificadora en contra de las mutaciones patológicas que dañan la función de la cadena respiratoria (Fan et al., 2008; Stewart et al., 2008b). Trabajos recientes, muestran que incluso variantes sanas de mtDNA murinas (NZB y 129) (Sharpley et al., 2012), también se ven

sometidas a una segregación específica del mtDNA en la línea germinal femenina. Por último, mutaciones en genes que codifican para tRNAs muestran también un comportamiento no aleatorio (Freyer et al., 2012), si bien es cierto, que la selección es menos intensa que en el caso de mutaciones en genes que codifican para proteínas mitocondriales.

En conclusión, está bien establecido la existencia de un mecanismo genético de cuello de botella en el mtDNA en la línea germinal femenina, así como una selección selectiva del mtDNA en la transmisión intergeneracional del mtDNA. Sin embargo los mecanismos que rigen estos procesos, así como el momento en que tienen lugar (desarrollo embrionario temprano; formación de PGCs, oogonias o maduración del ovocito) aún no se conocen con precisión.

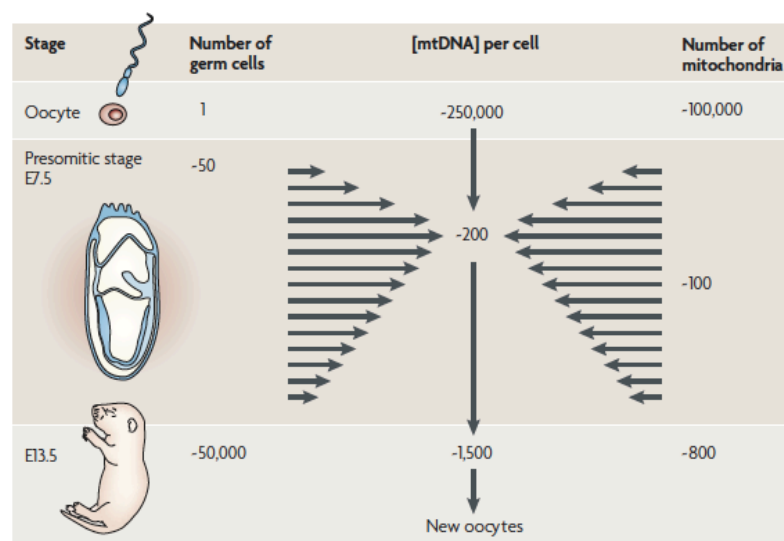


Figura I.8: Desarrollo de las células germinales en ratón y teorías que explican el cuello de botella del mtDNA. Los ovocitos son las células de mamíferos con mayor contenido de mtDNA, alrededor de 250.000 copias por célula. Durante las primeras etapas de desarrollo embrionario la gran cantidad de copias de mtDNA del ovocito no es replicado, y se distribuye entre las células hijas siendo la cantidad total de mtDNA similar entre un ovocito, un blastocisto y un embrión implantado de día E5.5 en ratón. Un trabajo realizado tras la generación de ovocitos de Rhesus heteroplasmicos, demuestra que la evolución hacia la homoplasmia puede ocurrir en estas etapas tempranas del desarrollo y el cuello de botella pudiese ya ocurrir en el epiblasto antes de la formación de las células primordiales germinales (PGCs) (Lee et al., 2012).

En ratón, ya en el día E7.5, se identifican las PGCs, las cuales proliferaran para generar un gran número de oogonias, muchas de las cuales sufrirán atresia durante la diferenciación del ovocito. Los dramáticos cambios en el número de copias de mtDNA entre las PGCs (alrededor de 200 copias) y el ovocito (más de 100.000 copias); sugirieron que el cuello de botella del mtDNA era debido a una reducción en el número de copias de mtDNA.

Estimaciones matemáticas (Jenuth et al., 1996) sugieren que para existir un cuello de botella genético mitocondrial, el número de unidades de segregación necesarias debe ser menor de 200. Así que este podría tener lugar en la formación de las PGCs, donde el número de copias de mtDNA por célula es alrededor de 200 (Cree et al., 2008) o bien durante la foliculogénesis, proponiendo que la asociación en nucleoides del mtDNA conlleva a una replicación de subpoblaciones que reduciría el número de unidades de segregación (Wai et al., 2008). Figura tomada de (Stewart JB et al; 2009).

Antecedentes y Objetivos

I. Antecedentes

En 1997 se publicó un trabajo fascinante en el que se generaron ratones heteroplásmicos que contenían las variantes Balb/c y NZB de mtDNA (Jenuth et al., 1997). Tras examinar los niveles de heteroplasma en varios tejidos, se observó que el hígado y riñón siempre acumulaban el mtDNA NZB, mientras que el bazo y la sangre acumulaban el mtDNA Balb/c. Se demostró así, por primera vez, la existencia de una segregación selectiva del mtDNA en un modelo de ratón. Han pasado más de 15 años desde esta observación y aun no se saben las causas que gobiernan dicha selección.

En modelos celulares, derivados de hepatocitos (Battersby and Shoubridge, 2001) o cíbridos transmitocondriales (Moreno-Loshuertos et al., 2006), se vio que los diferentes haplotipos de mtDNA (Balb/c vs. NZB) generaban una capacidad respiratoria similar, por lo tanto no había indicios para conjeturar que diferencias funcionales promovidas por el mtDNA pudiesen explicar el fenotipo de selección diferencial (Battersby and Shoubridge, 2001). Pero, en el trabajo realizado en nuestro laboratorio con cíbridos transmitocondriales, se demostró que tras la aparente igualdad en la capacidad respiratoria subyace un comportamiento desigual de la cadena de transporte electrónico que se revela mediante diferencias en la producción de H_2O_2 y en el número de copias de mtDNA por célula. Se propuso que los ROS optimizaban la capacidad respiratoria a través de la estimulación de la biogénesis mitocondrial (Moreno-Loshuertos et al., 2006).

Sin embargo, aunque estos últimos resultados han sido reproducidos en otros laboratorios (Fan et al., 2012; Ishikawa et al., 2010), han sido objeto de duras críticas. Una de las principales críticas recaía en el modelo de estudio, células inmortalizadas de ratón con fondo nuclear L929, altamente aneuploides, que no podían garantizar la uniformidad del fondo nuclear entre las diferentes líneas de cíbridos transmitocondriales y cultivadas en una atmósfera del 21% de oxígeno (Battersby and Shoubridge, 2007).

Con estos antecedentes, el objetivo inicial de esta tesis fue evaluar si las diferencias funcionales observadas *in vitro* son relevantes *in vivo*, y si son capaces de promover cambios funcionales específicos de tejido que expliquen la segregación diferencial del mtDNA observada en los ratones heteroplásmicos.

Para este estudio hemos utilizado las variantes mitocondriales de las líneas consanguíneas de ratón C57BL/6J y NZB/Ola/Hsd, adquiridos en Harlan Laboratories. Las razones de esta elección son: (i) que hay diferencias en la capacidad OXPHOS entre ambas variantes en los cíbridos transmitocondriales; (ii) que NZB presenta el comportamiento de segregación *in vivo*; (iv) que, aunque no había sido evaluada la segregación del haplotipo C57BL/6J, este se

comporta de manera similar a Balb/c en los modelos celulares, por lo que esperaríamos el mismo comportamiento de segregación que en los ratones heteroplásmicos Balb^{Balb-NZB} si son las diferencias funcionales las responsables de esta selección; y, por último, (v) que el genoma de la estirpe C57BL/6J se ha secuenciado en su totalidad.

II. Objetivos

1. Generación y caracterización de los modelos animales: ratones conplásticos (idéntico nDNA y distinto mtDNA) y heteroplásmicos (contienen dos variantes de mtDNA en la misma célula) y quiméricos (contienen dos variantes de mtDNA en células distintas)
2. Estudio de los efectos funcionales de las variantes de mtDNA no patológicas sobre el sistema OXPHOS, el metabolismo celular y fisiología del organismo.
3. Estudio de la segregación selectiva del mtDNA no patológico en tejidos somáticos y durante la transmisión intergeneracional.

Material y métodos

I. Material y métodos: modelos animales

I.1. Condiciones de alojamiento y experimentación

Los animales han sido alojados en la Unidad de Medicina Comparada del CNIC y mantenidos de acuerdo a la legislación española sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 1201/2005 y Ley 32/2007). La legislación española es una trasposición de la Directiva 86/609/EEC. Las condiciones de alojamiento y manejo reflejan las recomendaciones de la Comisión del Consejo de Europa del 18 de junio del 2007 sobre guías para el alojamiento y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los roedores han sido alojados en jaulas dentro de un sistema de rack ventilado, con una cama de viruta y material de nidificación suficiente. Salvo en caso de experimentos puntuales, todos los ratones disponen de comida y agua *ad libitum*. La dieta de mantenimiento utilizada ha sido 5K67 LabDiet®. El número máximo de animales por jaula está limitado y adaptado a la normativa vigente (Real Decreto 53/2013), que también establece las condiciones ambientales de humedad (HR: 45-65%) y temperatura (20-24°C).

Por último, todos los procedimientos animales realizados como parte del trabajo experimental con animales en esta tesis doctoral, han sido aprobados previamente por el Comité Ético.

I.2. Generación y mantenimiento de los modelos animales

I.2.1 Generación, mantenimiento y genotipado de ratones conplásticos

I.2.1.1 Generación de ratones conplásticos

Las líneas consanguíneas C57BL/6J OlaHsd y NZB Ola/Hsd proceden de Harlan Laboratories. Los ratones conplásticos fueron generados por retrocruzamiento de los animales durante un mínimo diez generaciones antes de iniciar los experimentos.

La hembra donadora del mtDNA se cruzó con el macho donador del nDNA, y las hembras nacidas en cada generación se cruzaron de nuevo con el macho donador del nDNA. De este

modo, se estableció una línea con el fondo nuclear C57BL/6J y el mtDNA NZB (BL/6^{NZB}). Y una segunda línea con el fondo nuclear NZB y mtDNA C57BL/6J (NZB^{BL/6}). (Figura M.1)

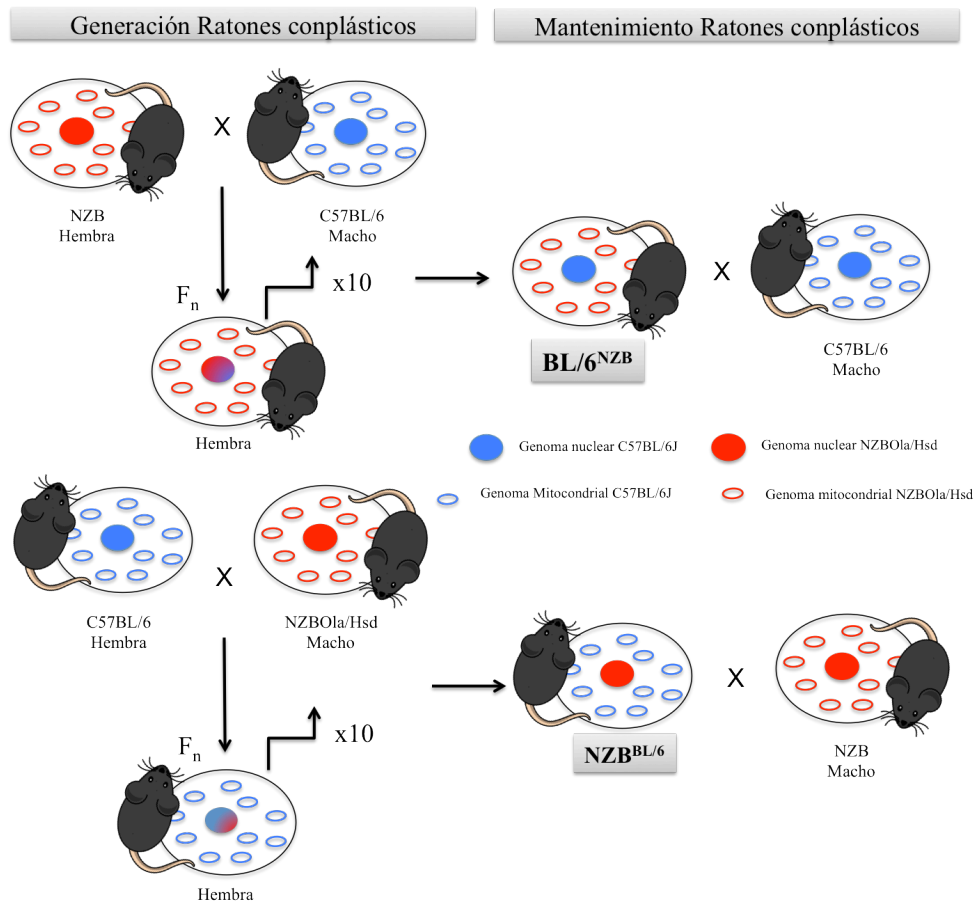


Figura M.1: Generación y mantenimiento de ratones conplásticos. Representación esquemática.

I.2.1.2 Mantenimiento de los ratones conplásticos

Las crías obtenidas tras 10 generaciones son consideradas conplásticas y son mantenidas mediante el cruce de las hembras conplásticas donadoras del mtDNA con los machos de la línea consanguínea receptora.

Las líneas conplásticas obtenidas son sanas y fértiles, y los parámetros morfológicos y reproductivos se asemejan a los ratones consanguíneos originales del mismo genoma nuclear. Pero hay diferencias muy notables entre las líneas con distinto genoma nuclear. Destaca el tamaño en cuanto a aspectos morfológicos, los ratones nNZB son mucho más grandes. En cuanto a parámetros reproductivos, los ratones nC57BL/6 presentan mejores índices de fertilidad. Además, hemos tenido graves problemas con el canibalismo en la línea nNZB, y la agresividad entre machos, obligando en muchos casos a su individualización.

Para evitar la acumulación de diferencias genéticas debido a la variabilidad individual y a la deriva genética de mantener stocks separados por un largo tiempo, en el mantenimiento de la línea C57BL/JOlaHsd se renuevan los reproductores cada seis generaciones con nuevos animales provenientes de Harlan.

I.2.1.4 Genotipado de ratones conplásticos

Análisis de variación de SNPs: RFLP

De modo rutinario el genotipado de los ratones se realizó por medio de la RFLP4276 para evaluar el mtDNA (ver apartado I.3.1). La pureza nuclear se evaluó por medio de 30 RFLPs que interrogaban 30 polimorfismos particulares de las líneas puras C57BL/6 y NZB, cubriendo los 20 cromosomas nucleares (*Tabla M.1* y *Tabla M.2*). Para la identificación de los SNPs se utilizó la herramienta de Jackson Laboratory: http://www.informatics.jax.org/strains_SNPs.shtml.

Análisis de variación de SNPs: Array

El DNA genómico total (500ng) proveniente de biopsias de cola de los ratones fue procesado de acuerdo con el protocolo de Affymetrix Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty (detalles en <http://www.affymetrix.com>). El Array de genotipado, “Affimetrix® Mouse Diversity Genotyping Array”, específico para ratón, contiene más de 623.000 SNPs, con una separación media de 4,3 kb.

De 572599 SNPs analizados, las estirpes C57BL/6J y NZB compartían en torno al 80% de los mismos. Para valorar el grado de semejanza entre cada línea conplástica y las originales se utilizó el grupo de SNPs homocigotos opuestos en cada línea.

El análisis se realizó en colaboración con el Grupo del Dr. D. Ángel Carracedo, de la Universidad de Santiago de Compostela.

Análisis de variación de SNPs: RNAseq

Tras el análisis de RNASeq (ver apartado 7.1), las secuencias consenso expresadas en el hígado y corazón de cada línea de ratón codificadas por genes del mtDNA o el nDNA fueron extraídas, y se determinó la probabilidad de identidad para esas secuencias. Además, se combinó esta información junto con la secuencia del exoma de 15 estirpes de ratón publicadas, permitiendo trazar un árbol dendograma.

El análisis se realizó en colaboración con la Unidad de Bioinformática del CNIC.

Cromosoma	Gen	SNP		Enzima	C57	NZB
		C57	NZB			
1	<i>Ndufs4</i>	T	C	<i>PvuII</i>	301	183+118
2*	<i>Myo3b</i>	A	T ^(het)	<i>AgeI</i>	234	118+116
2	Psmc3	A	G	<i>MspI</i>	241	123+118
3	<i>159475020</i>	C	T	<i>ApaI</i>	121+120	241
4	Vps13d	T	C	<i>MspI</i>	240	120+120
4*	<i>Megf6</i>	A	G	<i>BseYI</i>	170+71	117+71+53
5	<i>Dpp6</i>	T	C	<i>MspI</i>	241	121+120
5*	<i>Abcb1b</i>	T	A	<i>NlaIII</i>	241	122+119
6	<i>A03007L17Rik</i>	A	G	<i>HhaI</i>	121+118+2	241
7	<i>Trd12</i>	G	A	<i>ApoI</i>	185+56	122+63+56
8	<i>Gatad2a</i>	T	C	<i>HaeIII</i>	194+47	122+72+47
8*	<i>1700019B03Rik</i>	G	T	<i>NsiI</i>	241	121+120
9	<i>Nnmt</i>	C	T	<i>HaeIII</i>	109+80	189
10	<i>Hivep2</i>	A	C	<i>EcoRV</i>	241	123+118
11	Slc22a21	A	G	<i>PvuII</i>	241	120+121
11*	<i>Abcc3</i>	C	G	<i>BfuCI</i>	241	124+117
12	<i>Hif1a</i>	T	C	<i>MspI</i>	243	120+123
12*	<i>4930534B04Rik</i>	A	G	<i>BtsCI</i>	122+119	241
13	<i>Halpn1</i>	G	C	<i>HaeIII</i>	241	120+121
13*	<i>Unc5a</i>	G	A	<i>AvaII</i>	121+120	241
14	<i>Apex1; Osgep; Tmem55b</i>	G	C	<i>AgeI</i>	123+118	241
15	<i>Adcy8</i>	C	T	<i>HaeIII</i>	122+70+49	171+70
15*	<i>Esp1l</i>	A	G	<i>Hpy188I</i>	215+26	121+94+26
16	<i>Cd200</i>	T	C	<i>HaeIII</i>	241	121+120
17	<i>EG240038</i>	G	A	<i>MspI</i>	122+119	241
17*	<i>Flywch2</i>	G	C	<i>Bari</i>	126+115	241
18	<i>Zmat2</i>	C	A	<i>HhaI</i>	101+100	201
19	<i>Lqi1</i>	C	T	<i>HaeIII</i>	121+120	241
19*	<i>Pkd21l</i>	T	C	<i>AatII</i>	123+118	241
X	<i>Irs4</i>	G	A	<i>SmaI</i>	120+111	231

Tabla M.1: Validación del genoma nuclear por RFLP (1). Polimorfismos diferenciales nucleares entre C57BL/6J y NZB. Diseño de la RFLP y patrón de corte.

Chr	Oligo	Secuencia	Tamaño (G/C)	Tm (°C)
1	SNP-Chr1 F	AAATATCATA TAGCGCTTTA	20 (5)	50
	SNP-Chr1 R	TAAATCTTAAAACAAACAAAC	21 (4)	50
2	SNP-Chr2 F	TACCTGTGGT GCTGTTTGCTA	21 (10)	62
	SNP-Chr2 R	TCTCTCACATCCATCTATGGC	21 (10)	62
2b	SNP-Chr2b F	GCGGGTGAAGTTCTCCACG	19 (13)	64
	SNP-Chr2b R	CAAGAACGTCTAACCTTATAGC	22 (9)	62
3	SNP-Chr3 F	TTTTGTTTTG GTTTTTCGGTC	20 (7)	54
	SNP-Chr3 R	CTTTAGTTTGGGAATCATCA	20 (7)	54
4	SNP-Chr4 F	TTTCTACTC CAACCTTACAGA	23 (8)	60
	SNP-Chr4 R	GGTGAGAACCAGCCCTGTC	19 (12)	62
4b	SNP-Chr4b F	GCAAGCCTATATCCTGTAAG	20 (9)	58
	SNP-Chr4b R	CATCTTGTGCCTTTCTGATC	20 (9)	58
5	SNP-Chr5 F	GGGAGGATAT TGCCTCATT	20 (9)	58
	SNP-Chr5 R	CACATTTGACTAGAAATAACAAG	23 (7)	60
6	SNP-Chr6 F	CCGGTGGAAA AGGGCAGCC	19 (13)	64
	SNP-Chr6 R	GACTGTGAGGGCCATGCGG	19 (13)	64
7	SNP-Chr7 F	CAGCTGGCTT AACCTACAA	20 (10)	60
	SNP-Chr7 R	TAACAGAATAAGGAGGCTTCC	21 (9)	60
8	SNP-Chr8 F	GGTGCCACG ACTCTCTCG	19 (13)	64
	SNP-Chr8 R	GGTGGGAAGAGGTCAGCCAG	20 (13)	66
9	SNP-Chr9 F	TATCTAGAGC AGCAAGTGAC	20 (9)	58
	SNP-Chr9 R	GGAGAAGAGTCCTTCATTATT	21 (8)	58
10	SNP-Chr10 F	AGAGAGATGTCCCAAGGGGA	20 (11)	62
	SNP-Chr10 R	CTCAGGCTATACTTACAGGAG	21 (10)	62
11	SNP-Chr11 F	ACTGGCGGCT GTTGAAGTCC	19 (11)	60
	SNP-Chr11 R	TTGTGTACATGAAGCACACAC	21 (9)	60
12	SNP-Chr12 F	AGATTGGAGATGCTGGCTC	20 (10)	60
	SNP-Chr12 R	GCAATCAGTATTTTAATATCTT	22 (5)	54
13	SNP-Chr13 F	CTATGGAGGC TATCAAGGTC	20 (10)	60
	SNP-Chr13 R	ACAGTAACTATAGCATTTTATCC	23 (7)	60
14	SNP-Chr14 F	AATCAGGGGA GTCTGGAGTG	20 (11)	62
	SNP-Chr14 R	GGCACCATGCCCCGCGGTG	18 (14)	64
15	SNP-Chr15 F	TCAGGATGCA GAAGGGTCAT	20 (10)	60
	SNP-Chr15 R	TCCCTTGTTGTTTAGTATTCTTT	23 (7)	60
16	SNP-Chr16 F	GCCCTCCTTC ACCCCGGA	18 (12)	60
	SNP-Chr16 R	GTGGGTAAACACTTGACTCC	20 (10)	60
17	SNP-Chr17 F	TTTGTTACAT TCACTGCATTG	22 (6)	56
	SNP-Chr17 R	GAAAGGCCATCTTAGAATTC	20 (8)	56
18	SNP-Chr18 F	AGACTTTCCC GGGGGGG	17 (12)	58
	SNP-Chr18 R	TCATCCTTTCTCAAATCATAA	23 (7)	56
19	SNP-Chr19 F	GTCAAGGAAA ACAAGACTTTC	21 (8)	58
	SNP-Chr19 R	AGTTGGAAACTTCCACAGAA	20 (8)	56
X	SNP-ChrX F	CTCACCCAGA GAGCCTCC	18 (12)	60
	SNP-ChrX R	GGTTTCCTTCCTCACCTC	19 (11)	60

Tabla M.2: Validación del genoma nuclear por RFLP (2). Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

I.2.2 Generación, mantenimiento y genotipados de los ratones heteroplásmicos

I.2.2.1 Generación de ratones heteroplásmicos

Los ratones heteroplásmicos fueron generados mediante la fusión de cigotos BL/6^{C57} con cigotos BL/6^{NZB}. Estos últimos se enuclearon previamente.

El protocolo consta de cuatro pasos fundamentales: (i) Obtención de cigotos; (ii) Obtención de citoplastos; (iii) Obtención de parejas “cigoto-citoplasto”; (iv) Electrofusión. (*Figura M.2*). Este protocolo fue puesto a punto y realizado por Unidad de Transgénesis del CNIC.

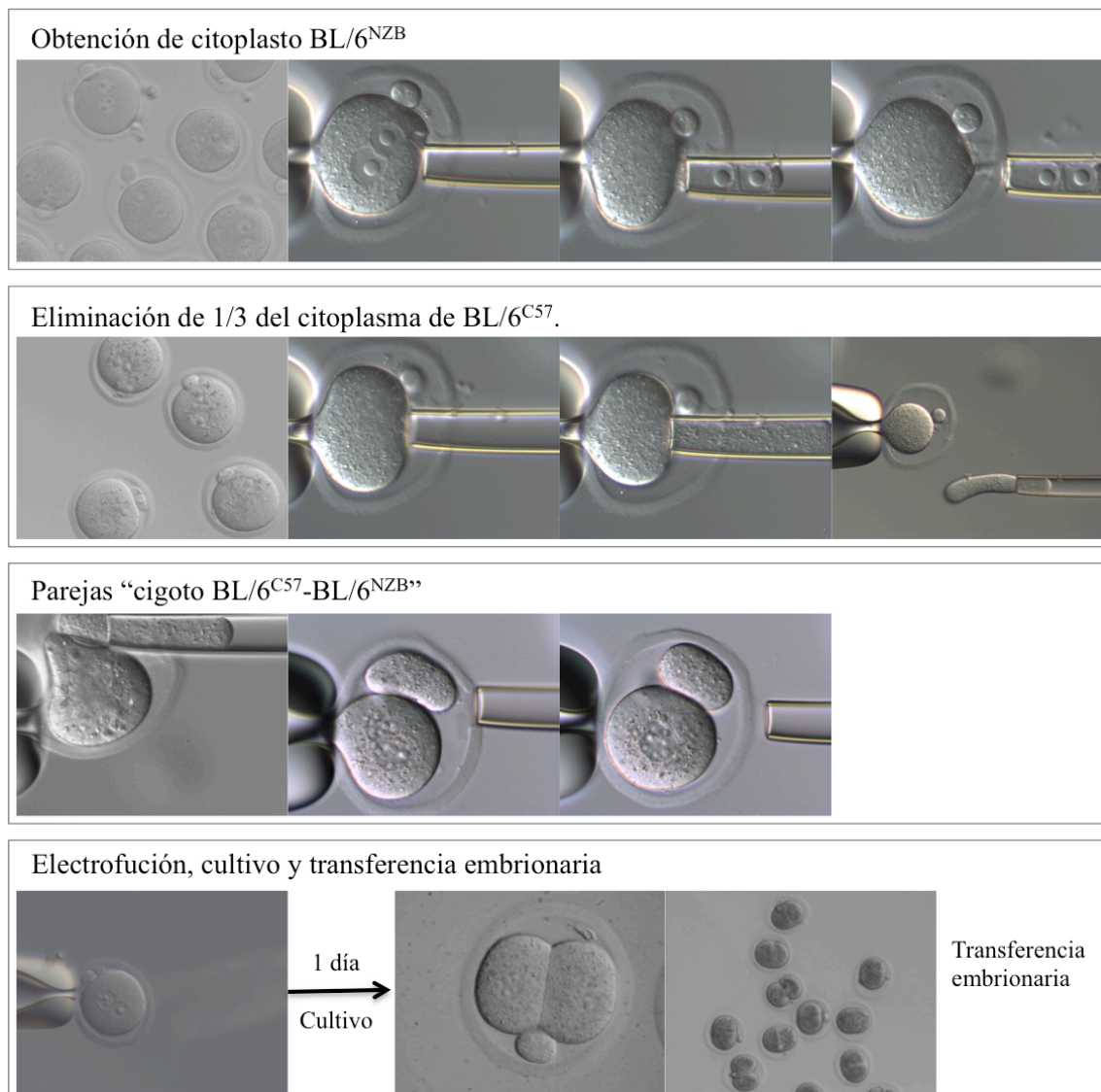


Figura M.2: Generación de ratones heteroplásmicos en imágenes. Fotos tomadas por la Unidad de transgénesis durante la enucleación y electrofusión de cigotos BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}

Obtención de cigotos BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}

Hembras prepúberes de las líneas BL/6^{NZB} y BL/6^{C57} con 4-5 semanas de edad fueron superovuladas por tratamiento hormonal con 5 UI/hembra de PMSG y, 46-48 horas después, con 5 UI/hembra de HCG. Las hembras así tratadas fueron puestas en cruce con machos fértiles BL/6^{C57}. A la mañana siguiente las hembras de ambas líneas con tapón de cópula son sacrificadas para la obtención de cigotos BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} que son incubados en medio KSOM^{AA} a 37°C y 5% CO₂ en aire.

Obtención de citoplastos C57BL/6^{NZB}

Para la obtención de los citoplastos, grupos de 10 cigotos BL/6^{NZB} y BL/6^{C57} fueron depositados en medio KSOM^{AA} conteniendo 5-mg/mL de Cytochalasin-B y 0,1-mg/mL de Colcemid e incubados a 37°C y 5% CO₂ durante 15-45 minutos. A los 15 min de incubación, se lavaron 5 cigotos BL/6^{NZB} en medio HEPES-KSOM^{AA} con 5-mg/mL de Cytochalasin-B y 0,1-mg/mL de Colcemid y depositados en la cámara de micromanipulación.

La cámara de micromanipulación para la obtención de citoplastos contiene una gota de 20 mL de medio HEPES-KSOM^{AA} + 5-mg/mL Cytochalasin-B + 0,1-mg/mL Colcemid, y está recubierta de Paraffin Oil.

La micromanipulación es realizó a temperatura ambiente (22-23°C) en un microscopio Zeiss AxioObserver-D1 con óptica Nomarsky a 400x aumentos. La *zona pellucida* (ZP) de cada cigoto BL/6^{NZB} es perforada con una aguja Eppendorf de 15-mm de diámetro interno en la punta que está acoplada al actuador de un equipo Piezo PrimeTech PMM-150FU. Luego el cigoto es enucleado por succión y recogido los 2 pronúcleos, obteniéndose así un “citoplasto primario” y, utilizando la misma aguja y el mismo procedimiento, es utilizado para la obtención de 2-3 “citoplastos secundarios” más pequeños.

Los “citoplastos secundarios” fueron mantenidos en la cámara de micromanipulación hasta ser introducidos en el espacio subzonal o perivitelino de los cigotos BL/6^{C57} antes de proceder a la electrofusión.

Obtención de parejas “cigoto BL/6^{C57}-citoplasto BL/6^{NZB}”

Inmediatamente después de la obtención de los “citoplastos secundarios” a partir de 5 cigotos C57BL/6Jmt^{NZB}, 10 cigotos BL/6^{C57} son retiraron del incubador, lavados en medio HEPES-KSOM^{AA} + 5-mg/mL Cytochalasin-B + 0,1-mg/mL Colcemid y depositados en la cámara de micromanipulación.

La ZP de cada cigoto BL/6^{C57} fue perforada de igual forma que la de los cigotos BL/6^{NZB} y luego se procedió a retirar un “citoplasto primario” BL/6^{C57} de un tamaño similar al de los “citoplastos secundarios” BL/6^{NZB} anteriormente obtenidos. Inmediatamente después, un “citoplasto secundario” BL/6^{NZB} es recogido con la aguja (I.D. = 15- μ m) e introducido en el espacio subzonal del cigoto BL/6^{C57} anterior. La pareja “cigoto BL/6^{C57}-citoplasto BL/6^{NZB}” así formada es dejada en un área determinada de la cámara de micromanipulación y se vuelve a repetir el proceso hasta disponer de 10 parejas formadas. Luego las parejas son retiradas de la cámara de micromanipulación y lavadas en una placa conteniendo HEPES-KSOM^{AA} a temperatura ambiente para eliminar la Cytochalasin-B y la Colcemid.

Electrofusión de las parejas “cigoto BL/6^{C57}-citoplasto BL/6^{NZB}”

La electrofusión de las parejas se realizó con un equipo BTX ECM 2001 Electro Cell Manipulator y una cámara de electrofusión (EF) BTX Model 450-1; utilizando tampón de electrofusión (TEF) compuesto de 0,3 M Manitol con 0,3%w/v BSA, pH 7,2-7,4 y filtrado por 0,20- μ m.

Las parejas se lavaron en una placa de Petri de 35-mm diámetro conteniendo 3-4 mL de TEF. Luego fueron depositadas en una gota de 100- μ L de TEF entre los electrodos de la cámara de electrofusión. Las parejas son orientadas manualmente de forma que las áreas de contacto entre los cigotos y los citoplastos están paralelas a los electrodos de la cámara de EF y consecuentemente perpendiculares a las líneas de fuerza del campo eléctrico.

La electrofusión entre el citoplasto y el cigoto de cada pareja es realizada utilizando los siguientes parámetros:

Orientación: AC=2V ; AC duración=6 sec

Fusión: 120 V , 25-msec; 2 pulsos.

Post-Fusión: AC=2V; AC duración=6 sec; Modo=automático

Las parejas así tratadas fueron recogidas y lavadas en una placa de Petri de 35-mm diámetro conteniendo 3-4 mL de HEPES-KSOM^{AA} a temperatura ambiente. Luego se lavaron en medio KSOM^{AA} y fueron dejadas en el incubador en gota de KSOM^{AA} a 37°C / 5% CO₂.

El proceso de obtención de citoplastos y electrofusión es repetido tantas veces como sea posible. Cada cierto tiempo, la placa KSOM^{AA} conteniendo las “parejas” electrofusionadas es visualizada y el número de parejas fusionadas es anotado. Las parejas no fusionadas son retiradas a otra gota que es visualizada más tarde por si la fusión estuviese retrasada.

Al día siguiente, los embriones que han progresado a E2C son utilizados para realizar transferencias embrionarias a hembras pseudogestantes de ratón.

I.2.2.2 Mantenimiento de los ratones heteroplásmicos

En dos experimento de electrofusión cigoto-citoplasto, se obtuvieron 9 animales heteroplásmicos con porcentajes de NZB en cola entre el 9-67%. Las hembras, un total de 4, fueron usadas como reproductoras y fundadoras de la colonia.

La pareja de reproductores esta formada por una hembra heteroplásmica BL/6^{C57-NZB} y un macho BL/6^{C57}. En la elección de las hembras reproductoras se ha tenido en cuenta los niveles de heteroplasma, eligiendo siempre aquellas hembras con mayor contenido del mtDNA NZB, ya que hay una tendencia a la eliminación de esta variante de mtDNA en las crías de las camadas obtenidas.

Esta línea de ratones son, aparentemente, similares a BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} tanto en aspecto, comportamiento y fertilidad.

I.2.2.3 Genotipado de los ratones heteroplásmicos

El genotipado rutinario ha consistido en la cuantificación de la heteroplasma en cola de las crías a los 28 días de edad, mediante la RFLP4276 (ver apartado I.3). Se generó una base de datos para llevar el registro de la heteroplasma de cada animal destetado.

I.2.2.4 Variantes de ratones heteroplásmicos

BL/6^{C57-NZB}-OMA1^{-/-}

Los ratones C57BL/6-OMA1^{-/-} fueron cedidos por el Dr. Carlos López-Otin (Quirós et al., 2012). La generación de los ratones heteroplásmicos OMA1^{-/-} se realizó mediante la siguiente pauta de cruces:

- Obtención de Heterocigotos +/-: BL/6^{C57-NZB} (hembra) \times BL/6^{C57}-OMA1^{-/-} (macho)
- Obtención de Homocigotos -/-: BL/6^{C57-NZB} – OMA1^{+/-} (hembra F1) \times BL/6^{C57}-OMA1^{-/-} (macho)
- Mantenimiento: BL/6^{C57-NZB} – OMA1^{-/-} (hembra F1) \times BL/6^{C57}-OMA1^{-/-}

Los ratones no presentaban diferencias aparentes. El genotipado de los ratones se realizó siguiendo las indicaciones publicadas (Quirós et al., 2012) para evaluar la presencia del gen OMA1, y la RFLP4276 para estimar los niveles de heteroplasma.

I.2.3 Generación, mantenimiento y genotipado de ratones quiméricos

I.2.3.1 Generación de los ratones quiméricos

La generación de quimeras mitocondriales se realizó mediante la agregación de embriones de 8 células (E8C) BL/6^{C57} con E8C BL/6^{NZB}.

El protocolo tiene cuatro pasos fundamentales; (i) preparación de placas de agregación; (ii) obtención de embriones; (iii) eliminación de la zona pelúcida; (iv) agregación de embriones y transferencia de embriones a una hembra pseudogestante.

Este protocolo fue puesto a punto y realizado por Unidad de Transgénesis del CNIC.

Preparación de la placa de agregación:

El día anterior a la realización de las agregaciones embrionarias se preparó la placa de agregación. En una placa de cultivo de 35mm se colocan unas 15 gotas (15ul) de medio KSOM y se cubre con aceite mineral, con la ayuda de una aguja se realizaron depresiones en cada gota de KSOM (unas 6 depresiones por gota, evitando el centro). La placa se guardó en el incubador a 37°C y 5%CO₂ hasta su utilización.

Obtención de E8C

Hembras prepúberes BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} con 3-5 semanas de edad fueron superovuladas por tratamiento hormonal con 5 UI/hembra de PMSG y, 46-48 horas después, con 5 UI/hembra de HCG. Las hembras así tratadas fueron puestas en cruce con machos fértiles BL/6^{C57}. A la mañana siguiente se comprueba en las hembras el tapón de cópula, y un día después se obtuvieron los E8C por lavado del infundíbulo con HEPES-KSOM, y se mantuvieron en medio KSOM^{AA} a 37°C y 5% CO₂ en aire.

Eliminación de la zona pelúcida.

La eliminación de la zona pelúcida (ZP) de los E8C se realizó con ácido tyrode. Se colocan 3 gotas de 10μl de ácido tyrode en una placa de Petri, lavando el embrión en las dos primeras gotas, y dejándolo en la tercera gota unos 30 segundos, hasta que la ZP se desintegre. Y se añadió 700μl de HEPES-KSOM.

Agregación de E8C y transferencia de blastocistos a una hembra pseudogestante.

Los embriones se recogieron y lavaron con HEPES-KSOM, y fueron depositados en la placa de agregación, colocando en cada pocillo los dos embriones que se deseaban agregar con KSOM. Se dejó incubando O/N a 37°C y 5%CO₂.

Al día siguiente de la agregación, los embriones que habían evolucionado a blastocisto se transfirieron al infundíbulo de una hembra receptora de la línea CD-1.

I.2.3.2 Mantenimiento de los ratones quiméricos

Los ratones quiméricos mitocondriales sólo pueden obtenerse mediante la agregación de embriones, el ovocito (una sola célula) tiene condición homoplásmica.

I.2.3.3 Genotipado de los ratones quiméricos

El genoma nuclear que lleva el animal quimérico es idéntico. Se evaluó el grado de quimerismo mediante la contribución de cada variante de mtDNA, con la RFLP4276.

I.3. Cuantificación de la heteroplasmia

La cuantificación de la heteroplasmia se realizó siempre a partir de una muestra de DNA aislada de la muestra problema. El fundamento de las técnicas utilizadas aprovecha la existencia de polimorfismos entre las secuencias de mtDNA C57BL/6 y NZB (*Figura M.3*).

Para la extracción de DNA de tejidos se utilizó de forma rutinaria el kit de Qiagen DNeasy Blood&Tissue y el kit de Sigma-Aldrich REDExtract-N-AmpTM Tissue PCR.

I.3.1 RFLP G4276A y Bromuro de Etidio

PCR 4276: La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25µl con el kit 5Prime Master Mix (5Prime): 10µl de Master Mix (2.5X), 250nM de ambos oligos y 25-50 ng de DNA. La temperatura de hibridación de la PCR fue de 58°C durante 30'', seguido de 45'' de elongación (30 ciclos).

Fragmento de PCR, 664 bp.

ND2L (Fw): 5' AAGCTATCGGGCCCATAACCCG 3' (posición: 3862-3884)

ND2 HA (Rv): 5' GTTGAGTAGAGTGAGGGATGGG 3' (posición: 4503-4525)

Digestión enzimática G4276A: El producto de PCR se digirió con la enzima BamH1 (NEB) a 37°C durante 2 horas. Para la digestión se añadió a cada muestra de PCR de 25µl: 0.01µl de BSA (10mg/ml), 1µl de Buffer 3, 0.5µl de enzima BamH1(20.000 U/ml), y 13.5µl de H₂O.

Electroforesis del producto de la digestión: en gel horizontal de agarosa (1,5% en TAE 1X y 5µg/ml de Bromuro de Etidio). Patrón de bandas:

- Homoplásmia mtDNA NZB: 664 pb
- Homoplásmia mtDNA C57BL/6: 414 pb + 250 pb
- Heteroplásmia mtDNA C57BL/6 + NZB: 664 pb + 414 pb + 250 pb

Análisis de resultados: Tras la obtención de la imagen con el Gel DocTM XR+ System de Bio-Rad, se cuantificó la intensidad de las bandas con el software “Quantity One 1-D Analysis Software”.

I.3.2 RFLP G4276A y SYBR Green

PCR4276: La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20µl que contenía 10µl de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem), 250nM de ambos oligos y 5ng de DNA, en el sistema de Detección de Secuencia (SDS) 7900FAST de Applied Biosystems, en una placa de 96 pocillos. El programa utilizado consistió en 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.

Fragmento de PCR, 143 bp.

4276 SYBR Fw: 5' TAGGCCTCGCCCCATTCC 3'

4276 SYBR Rv: 5' GATAGTAGAGTTGAGTAGCGGG 3'

Digestión enzimática G4276A: El producto de PCR se digirió directamente con la enzima BamH1 (0.01µl de BSA (10mg/ml), 1µl de Buffer 3, 0.5µl de enzima BamH1(20.000 U/ml), y 13.5µl de H₂O), durante 1-2 horas a 37°C.

Curva de disociación: tras la digestión, se volvió a colocar la placa en el SDS 7900FAST y se sometió la muestra a una etapa de disociación, mediante un incremento gradual de la temperatura durante 20 minutos de 65°C a 90°C.

Análisis de resultados: La RFLP fue diseñada de tal forma que se pudiese distinguir los fragmentos obtenidos tras la digestión enzimática por su temperatura de *melting* (T_m):

- Homoplásmia mtDNA C57BL/6:
47 pb (51,1% GC) + 96 pb (35,4% GC); $T_m = 72^\circ\text{C}$ ambos fragmentos.
- Homoplásmia mtDNA NZB/B1NJ:
143 pb (40,6% GC); $T_m = 77^\circ\text{C}$.
- Heteroplásmia mtDNA C57BL/6 + NZB/B1NJ:
143 pb (40,6% GC) + 47 pb (51,1% GC) + 96 pb (35,4% GC); $T_m = 77 + 72^\circ\text{C}$

El área bajo la curva y el pico de la temperatura de *melting* fue analizado con el Software “SDSv2.4” de Applied Biosystems.

I.3.3 Análisis de variación de un nucleótido por minisecuencia en fase sólida

El método está basado en una amplificación de PCR en la cual el oligo reverso está biotinilado en el extremo 5'. El producto de PCR es capturado en una placa tratada con estreptavidina y el nucleótido de diferencia es detectado mediante la técnica de extensión de cebadores (“primer extension”) aplicada en el fragmento de DNA inmovilizado. Para ello se utiliza un oligonucleótido que hibrida justo en la región adyacente del nucleótido que queremos interrogar, que se extenderá con una DNA polimerasa que incorporará el nucleótido complementario marcado con el radioisótopo ^3H . De esta manera, la incorporación radioactiva sirve como un indicador específico del nucleótido presente en el sitio polimórfico. Se siguió el protocolo ya descrito previamente (Wartiovaara and Syvänen, 2002).

PCR3932: Se amplificó un fragmento de PCR de 75 pb en un volumen de 50 μl de reacción y con una temperatura de hibridación de 56°C ; con el objetivo es detectar el cambio de una guanina (C57BL/6) por una adenosina (NZB) en la posición 3932 del mtDNA; para ello utilizaremos [^3H]dGTP and [^3H]dATP respectivamente.

Oligonucleótidos:

3892-3913 Fw: 5' GGTTTAAATCCTTCCCGTACTA 3'

3947-3966 Rv: 5' [Btn]-ACAGGACCTAAGAAGATTGTG-3'

Antes de seguir con el protocolo se comprobó la amplificación de la PCR en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X.

Captura de Afinidad y desnaturalización del producto de PCR: Para la captura de afinidad se usaron pocillos tratados con estreptavidina (Thermo Scientific STREPTAVIDIN-CTD COMBIPLT). Se añadieron, por pocillo, 40 μl de PBS 1X + 0,1% Tween y 10 μl del producto de PCR. Hay que utilizar dos pocillos por muestra (para interrogar con los dos nucleótidos

marcados radiactivamente). En cada experimento se pusieron controles negativos y controles de ambas muestras en homoplásmia.

Los pocillos se taparon con una tapa adherible y desechable (Plateseal, Removable and Resealable, Perkin Elmer) y se incubó a 37°C durante 1 hora y 30 minutos en agitación a 450 rpm.

Se descartó el líquido de los pocillos, y se lavó tres veces a temperatura ambiente con 200µl de solución TENT (40mM Tris-HCl pH8,8, 1mM EDTA, 50mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, guardado a 4°C).

Los lavados se realizaron con un lavador automático de placas (Wellwash 4MK2, Thermo Labsystem).

A continuación se desnaturalizó el producto de PCR capturado mediante la adición de 100µl de 50mM NaOH a cada pocillo. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, y se volvió a lavar 3 veces con la solución TENT.

Primer Extension: Para cada fragmento de DNA que se quería analizar se preparó una mezcla de 50µl con el nucleótido específico para la minisequenciación: 42µl de H₂O, 2µl del oligo de detección (2µM), 5µl de 10x Buffer, 0.05µl Dynazyme II (0,1U) (Thermo Scientific, F-550L) y 0.2µl de [³H]dNTPs.

Oligo de detección:

3911-3931 Dt: 5'-CTAATAAATCCTATCACCTT-3'

Nucleótidos marcados:

- Deoxy (8-³H) guanosine 5'-triphosphate, Amershan TRK350. Con una actividad específica de 17.9 Ci/mmol. (detecta la secuencia del mtDNA de C57BL/6)
- Deoxy (8-³H) adenosine 5'-triphosphate, Amershan TRK347. Con una actividad específica de 33 Ci/mmol. (detecta la secuencia del mtDNA de NZB/B1NJ)

Se añadió 50µl por pocillo de cada una de las mezclas específicas para cada nucleótido, y se incubó durante 10 minutos a 50°C en un baño de agua. Se descartó el líquido de los pocillos y se volvió a lavar 3 veces con la solución TENT.

Detección: Con el objetivo de soltar el oligo de detección extendido con el nucleótido marcado, se añadió 60µl de NaOH 50mM y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Cada oligo eluido se transfirió a viales de centello (plastic, PerkinElmer) que contenían 3 ml del reactivo para centello (Optiphase “Hisafe” 2, PerkinElmer 1200-436 for 1x5L), y se midió la actividad en un contador de centello líquido (MicroBeta2 Plate Counter PerkinElmer). Se registró el valor de cpm (cuentas por minuto) de cada reacción, que indica la cantidad de [^3H]dNTP incorporado.

Análisis de datos: Los datos fueron analizados con el software MicroBeta2 Workstation. La ratio entre los valores de cpm de los dos nucleótidos (R), corregido por la actividad específica del [^3H]dNTP incorporado, refleja la ratio entre las dos secuencias de mtDNA en la muestra original.

La validez de la técnica, se evaluó mediante la construcción de una curva estándar, en la cual se mezclaron muestras de mtDNA homoplásmico para obtener concentraciones conocidas.

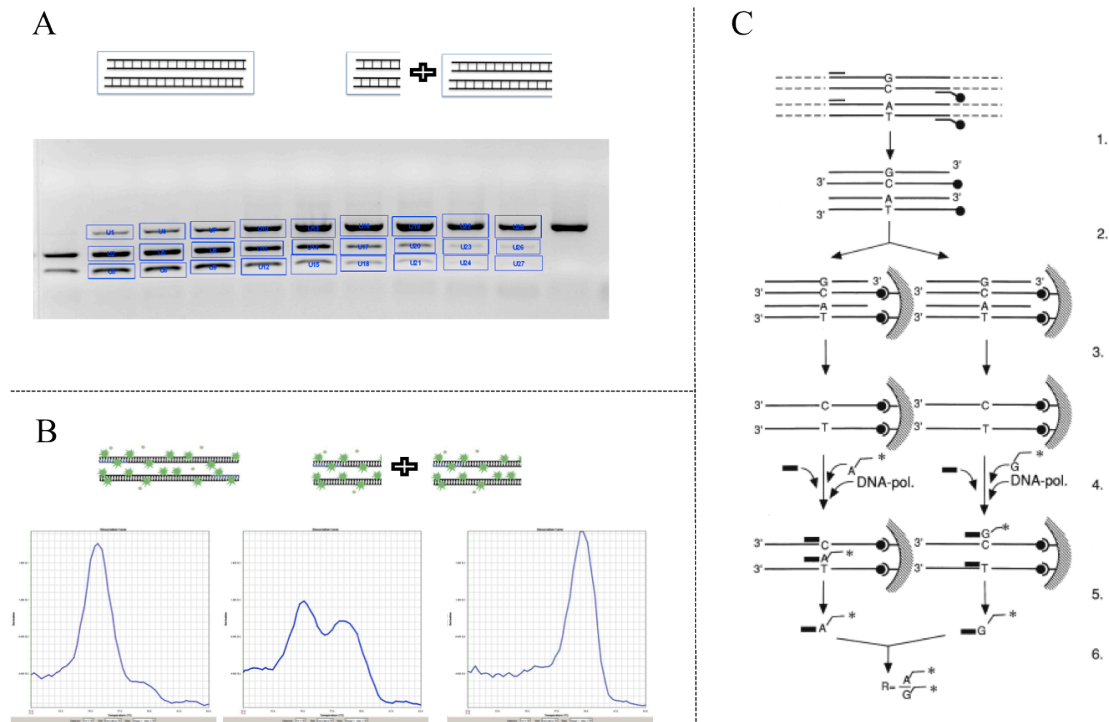


Figura M.3. Cuantificación de la heteroplasmia. (A) RFLP4276 y Bromuro de etidio. Gel representativo de la cuantificación de 11 muestras ordenadas por su nivel de heteroplasmia desde homoplásmicas C57BL/6 a homoplásmicas NZB. (B) RFLP4275 y SYBRgreen. Imágenes representativas de la curva de disociación de una muestra homoplásmica C57BL/6, heteroplásmica y homoplásmica NZB. (C) Esquema representativo de la técnica “Minisequencing” (*imagen tomada de Wartiovaara A. and Syvänen AC, 2002*)

Todos los resultados de los valores de heteroplasmia presentados en esta tesis doctoral han sido analizados por la RFLP4276 con Bromuro de Etidio. Para la elección se tuvo en cuenta, en primer lugar la especificidad de la técnica, (comparable entre la RFLP con Bromuro y

Minisequencing, y notablemente peor en la RFLP con SYBRgreen), y el segundo nivel de decisión fueron razones prácticas y económicas.

I.4. Determinaciones de la función mitocondrial

I.4.1 Determinación del H_2O_2 en tejidos mediante el uso de la sonda Mito B.

Fundamento: El Mito B se usa para evaluar la cantidad de H_2O_2 dentro de la matriz mitocondrial en los diferentes tejidos en ratones. Es una sonda de espectrometría de masas ratiométrica, ((3-hydroxybenzyl)triphenylphosphonium bromide) que contiene un componente catiónico trifenilfosfónico (TPP) y un grupo arilborónico (Cochemé et al., 2012; 2011). El grupo arilborónico del MitoB reacciona con el H_2O_2 para formar un producto fenólico, el MitoP. La evaluación de la conversión MitoB a MitoP mediante la cuantificación del ratio MitoB/MitoP permite la determinación del H_2O_2 mitocondrial (Figura M.4).

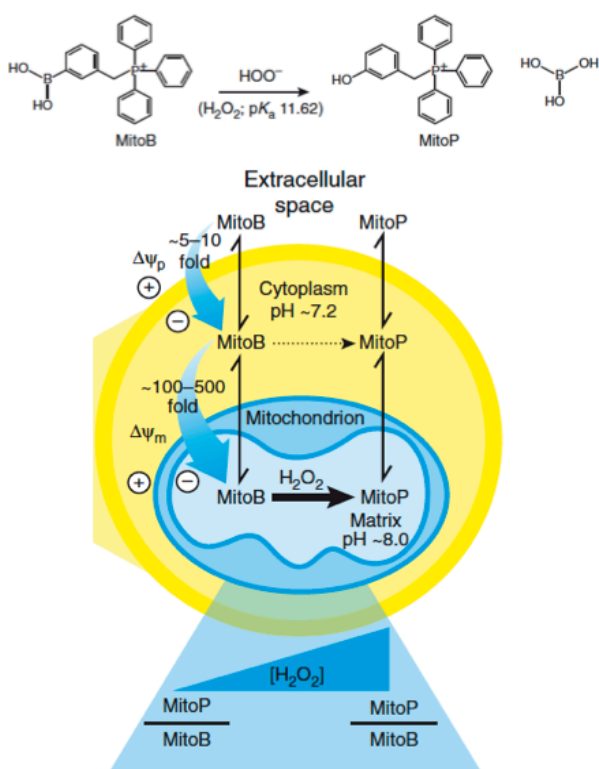


Figura M.4: Estructura del MitoB y del producto MitoP tras la reacción con HOO^- . Acumulación y reacción en la matriz mitocondrial. Hay dos hechos que aumentan la especificidad mitocondrial de la reacción. El primero de ellos es que el cation TPP es lipofílico, y debido al potencial de membrana mitocondrial, el MitoB se acumula preferentemente en la mitocondria in vivo. Además, en la reacción actúa como oxidante el ácido arilborónico que en realidad es la base conjugada del H_2O_2 ($pK_a=11,62$ a $25^\circ C$), provocando que la reacción del MitoB con el H_2O_2 sea más rápida en la matriz mitocondrial ($pH \approx 8$) que en el citosol ($pH \approx 7,2$).

Imagen tomada de (Cochemé et al. 2012)

Protocolo:

Administración de Mito B: Administración I.V. por la vena de la cola, de 100 μ l de MitoB 0,25mM en PBS1X. Solución stock de MitoB (PM 477,1): 10mM en etanol a $-20^\circ C$. Transcurridas 6 horas de la inyección (cronometradas en cada animal), se sacrificó al animal por dislocación cervical y se procedió a la disección de los tejidos con congelación rápida en

nitrógeno líquido. Los tejidos se guardaron a -80°C hasta la extracción del MitoB de los mismos.

Extracción del Mito B: Para la extracción del MitoB de los tejidos se añadió 100mg de tejido en un eppendorf de 2ml con 500 μl 60%ACN/1%FA, y se homogenizó en el ultraturrax. Se lavó el homogenizador con 250 μl de 60%ACN/1%FA y se añadió a la muestra homogeneizada. En este punto, para corregir variaciones que puedan ocurrir durante la extracción, se utilizaron MitoB y MitoP deuterizados como estándares internos. Para ello se realizó un stock de d_{15} -MitoB (PM 492,2) 10mM en etanol, y otro de d_{15} -MitoP (PM 464,4) 10mM en etanol. Con ambas soluciones se realiza un mastermix de 10 μM d_{15} -MitoB/5 μM d_{15} -MitoP en etanol. A los 750 μl que tenemos de la homogeneización del tejido se le añadieron 10 μl del mastermix 10 μM d_{15} -MitoB/5 μM d_{15} -MitoP, y se agitó vigorosamente durante 30s; tras lo cual se centrifugó a 16000xg durante 10min. A continuación se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, y el pellet se resuspendió en 500 μl de 60%ACN/0,1%FA y se volvió a centrifugar a 16000xg durante 10min. Se juntan ambos sobrenadantes y se volvió a centrifugar a 16000xg durante 10min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio filtrándolo con un filtro de PDVF de 0,22 μm ; y se secó en el Speed Vac durante 2-3h o toda la noche.

Llegados a este punto, las muestras se enviaron al laboratorio del Dr. D. Michael Murphy (Cambridge, UK) donde se analizaron por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS).

I.4.2 Aislamiento de mitocondrias a partir de tejidos de ratón: hígado

Fundamento: el objetivo es obtener mitocondrias funcionales, puras e intactas, con el mayor rendimiento posible, de los diferentes tejidos para medir síntesis de ATP y consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas. Las bases teóricas del protocolo se basan principalmente en una combinación de centrifugaciones diferenciales junto con la osmolaridad del buffer de extracción. El tiempo es un factor crítico en este proceso, todos los pasos se realizan siempre en hielo o a 4°C , para minimizar todo lo posible el efecto adverso de fosfolipasas y proteasas (Frezza et al., 2007).

Reactivos:

- Medio A: 0,32M Sacarosa, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-Na; pH 7,4 (en frío)

Procedimiento: Se sacrificó a los animales por dislocación cervical. Rápidamente se extrajo el hígado, prestando especial cuidado a identificar y eliminar la vesícula biliar. Inmediatamente se depositó el órgano en un falcon de 50ml con Medio A previamente enfriado y en hielo.

El protocolo consta de dos pasos principales, en primer lugar la preparación del homogenado tisular y en segundo lugar el aislamiento de mitocondrias.

Para preparar homogenados tisulares, el hígado recién extraído se colocó en una placa de Petri, sobre una cama de hielo, que contenía medio de homogeneización frío (Medio A). Se troceó finamente con ayuda de unas tijeras, y se lavó varias veces con Medio A para eliminar la mayor cantidad posible de sangre y grasa. A continuación se homogeneizó el troceado tisular con un potter tipo Elvehjem con un émbolo de teflón a 600 rpm usando 5ml de Medio A frío (4ml/gr de tejido).

El homogenado obtenido se transfirió a un tubo falcon de 15ml y se centrifugó a 1000xg durante 5 minutos a 4°C en un rotor basculante (AS4.12). El sobrenadante, que contiene las mitocondrias, se repartió en tubos eppendorf de 1,5ml y se centrifugó en una microfuga a 8.000-9.000xg durante 2 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento resultante, que es de color marrón-beige y no debe contener restos de sangre, se volvió a resuspender en Medio A, juntando el contenido de dos tubos en uno y se centrifugó a las mismas condiciones. Esta operación se repitió hasta tener todo el sedimento en un tubo, y hasta que el sobrenadante fuese completamente transparente.

Para la extracción de mitocondrias de riñón y cerebro se siguió el mismo protocolo, variando el volumen de Medio A usado para la homogeneización del tejido: 5ml de por gramo en ambos tejidos.

El sedimento final se resuspendió en 1ml de medio A y se midió la concentración de proteínas con el kit DC Protein Assay (Bio-Rad; Lowry Method). Se volvió a centrifugar y se resuspendieron las mitocondrias según el objetivo:

- Consumo de Oxígeno: 10µg/µl en Medio Maite (25 mM sacarosa, 75 mM sorbitol, 100 mM KCl, 0.05 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH=7.4, 10 mM H₃PO₄. El pH de la disolución se ajusta añadiendo Tris base 0.5 M).
- Síntesis de ATP: 5µg/µl en Medio A.

I.4.3 Ensayo de Síntesis de ATP

Fundamento: El objetivo es medir la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa. El ensayo se realizó en mitocondrias aisladas y frescas, para que tenga lugar la fosforilación del ATP, las mitocondrias tienen que estar intactas y acopladas. Es imprescindible medir el estado

de acoplamiento de las mitocondrias por polarografía paralelamente, ya que se trata de un aspecto crítico de este tipo de medida.

Se trata de un ensayo cinético de luminiscencia, en el que la detección de ATP se realizó por métodos fluorimétricos haciendo uso del sistema de luciferina-luciferasa:



La reacción produce un máximo de emisión a 560nm, siendo la intensidad proporcional a la cantidad de ATP (Vives-Bauza et al., 2007).

Reactivos y Buffers:

- Buffer A: 150mM KCl, 25mM Tris-HCL, 2mM EDTA, 0,1% BSA FA, 10mM K-PO₄, 0,1mM MgCl₂. Ajustar el pH a 7,4, guardar a -20°C. Para el experimento usar a temperatura ambiente.
- Buffer B: 0,5M Tris-Acetato, 0,4mM luciferina, 10µg/ml de luciferasa, pH 7,75. Preparar 10 minutos antes del experimento añadiendo 0,4mM luciferina (Beetle Luciferin, Potassium Salt, Promega, stock en alícuotas 100mM en agua y guardado a -80°C) y 10µg/ml de luciferasa (Luciferase from Photinus pyralis, Roche, stock en alícuotas 1mg/ml en 0,5M de Tris-acetato, pH 7,75 y guardado a -80°C). Mezclar por inversión cuidadosamente. Descongelar y mantener en hielo y protegido de la luz. Para testar la estabilidad del complejo luciferina-luciferasa en el buffer B, se mide la luminiscencia proveniente de diluciones fijas de ATP al principio, durante y al final del experimento.
- Diadenosina pentafofato: 6mM en H₂O. Filtrar, alícuotar y congelar a -20°C. Es un inhibidor de la adenilato quinasa. Cuando se añade ADP a las mitocondrias, hay un incremento rápido inicial de la luminiscencia debido a la actividad de esta enzima (2ADP \rightleftharpoons ATP+AMP)
- Piruvato y Malato: 100mM en buffer A. Filtrar, alícuotar y congelar a -20°C.
- ADP: 6mM en buffer A. Preparar fresco.
- ATP: 10mM en Buffer A. Preparar fresco.

Protocolo:

La luminiscencia se midió en un luminómetro de placas (Orion Microplate Luminometer) y el software Simplicity 4.2. Se configuraron dos plantillas de medida: punto fijo de medida (curva estándar) y una cinética que recogiese la luminiscencia durante 2 minutos. Las placas

utilizadas son de poliestireno blancas, de fondo plano (Costar Assay Plate 96 well).

El luminómetro utilizado mide la luminiscencia pocillo por pocillo, por ello las medidas se hicieron por columnas, es decir, se leyeron 8 muestras durante 2 minutos, obteniendo 10 medidas de cada muestra para la curva cinética.

Preparamos la placa añadiendo a todos los pocillo de la placa 160 μ l de Buffer A con ayuda de una pipeta multicanal.

Curva estándar de ATP: Como la luminiscencia es directamente proporcional a la producción de ATP, se realizó una curva estándar de “ATP-luminiscencia”. Se prepararon 7 diluciones de ATP: 0-0,05-0,1-0,5-1-5-10mM de ATP en buffer A. En la primera columna se añadieron por pocillo 10 μ l de la solución de ATP y a continuación 20 μ l de Buffer B. Y se midió la luminiscencia usando el programa de un solo punto de lectura. Se repitió la curva estándar cada 6 columnas medidas.

Muestras problema: en primer lugar se añadió 5 μ l de la suspensión de mitocondrias (5ng/ μ l en Medio A). A continuación con la ayuda de la multicanal se añadieron los sustratos, 5 μ l Diadenosin Pentafofato + 5 μ l Piruvato /Malato + 5 μ l de ADP (es conveniente hacer un mix de los tres compuestos y añadir 15 μ l de una vez). Por último se añadieron 20 μ l de Buffer B, y se registró la luminiscencia durante 2 minutos. Es recomendable realizar los triplicados de las muestras en distintas columnas.

Para el análisis de datos, se realizó primero un análisis de la línea de regresión para la correlación entre la concentración de ATP y la luminiscencia luciferina-luciferasa dependiente; y la síntesis de ATP fue calculada como los nmoles de ATP producidos en un minuto por cantidad de proteína mitocondrial.

I.4.4 Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas

Fundamento: Los estados respiratorios se definieron experimentalmente valorando el comportamiento respiratorio de mitocondrias aisladas durante la incubación en un medio isotónico en presencia de donadores de electrones (sustratos). Así, se define como respiración en estado 4 a la tasa de consumo de oxígeno en ausencia de ADP (una vez consumido el ADP endógeno). Al añadir ADP se produce un incremento en la tasa de consumo de oxígeno, respiración en estado 3. Cuando no existen diferencias entre el estado 3 y el estado 4 (Respiratory Control Ratio (RCR) =1), las mitocondrias se encuentran totalmente desacopladas; mientras que, RCRs mayores de 3 indican mitocondrias que están fuertemente acopladas.

El consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas se midió en un electrodo tipo Clark termostatzado (Oxytherm, Hansatech Instruments) compuesto por un cátodo de platino (Pt) y un ánodo de plata (Ag), inmersos en una solución de cloruro potásico saturado al 50% y separados por una membrana de teflón permeable al oxígeno. Sobre la pieza que contiene los electrodos se coloca una pieza que incluye la cámara de reacción rodeada por otra cámara termostatzada que mantiene la reacción a la temperatura deseada, en nuestro caso 37°C. La cámara se cierra con un émbolo provisto de una abertura capilar en su centro para permitir la salida de aire y la adición de reactivos durante el experimento. La corriente que se genera tras la aplicación de un voltaje polarizante de 700mV está estequiométricamente relacionada con el oxígeno consumido en el cátodo. Así, los datos obtenidos en cada experimento se registraron en un PC con el programa Oxygraph Plus V1.00 de Hansatech Instruments.

Reactivos y Buffers:

- Medio MAITE: 25 mM sacarosa, 75 mM sorbitol, 100 mM KCl, 0.05 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH=7.4, 10 mM H₃PO₄. El pH de la disolución se ajusta añadiendo Tris base 0.5 M y se esteriliza en el autoclave a baja presión.
- BSA libre de ácidos grasos: 10% en H₂O. Filtrar, alicuotar y congelar a -20°C.
- ADP: 50 mM en H₂O, ajustar el pH a 6.5-6.8 con KOH diluido y añadir MgCl₂ a una concentración final de 20 mM. Filtrar, alicuotar y congelar a -20°C.
- Piruvato, malato, succinato: Preparar individualmente a una concentración 1M en H₂O, ajustar el pH a 7.0 con KOH. Filtrar, alicuotar y congelar a -20°C. Dilución de trabajo 100mM
- Rotenona: 500μM en etanol. Alicuotar y congelar a -20°C. Dilución de trabajo 100μM.
- KCN: 400mM en H₂O, Filtrar, alicuotar y congelar a -20°C.

Protocolo:

En nuestro caso, se midió el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas en presencia de donadores de electrones (sustratos) y ADP (estado III de la respiración).

Antes de empezar cada sesión de trabajo con el electrodo, se fijó la temperatura del Oxytherm, a 37°C y se calibró el aparato estableciendo el cero mediante adición del ditionito de sodio que secuestra el oxígeno del medio.

La adición de sustratos e inhibidores de la cadena de transporte electrónico se realizó usando jeringas Hamilton de 10 o 25μl. Y después de cada medida, la cámara de reacción se lavó con agua y con albúmina sérica bovina (BSA) al 10%, para eliminar los restos de inhibidores.

Las mitocondrias se resuspendieron en medio MAITE a una concentración de 10µg/µl.

El proceso se llevo a cabo en la cámara termostatzada a 37°C en un volumen de reacción de 1ml. Se añadieron 900ul de medio de incubación (MAITE) seguidos de 10µl de BSA libre de ácidos grasos (1mg/ml), para evitar el desacoplamiento de mitocondrias debido a la presencia de ácidos grasos, y los sustratos de interés:

5mM Piruvato más 5mM Malato

5mM Succinato más 100mM de rotenona

5mM Glutamato más 5mM Malato

A continuación se añadieron las mitocondrias (100µg de proteína mitocondrial), se cerró la cámara y se puso en marcha el registrador (PC). Tras unos segundos, necesarios para que las mitocondrias se estabilizaran y agotaran su ADP endógeno en la fosforilación oxidativa, se añadieron 100 nmoles de ADP para activar la respiración y llegar al estado 3. La reacción se terminó con la adición de 2mM de KCN para determinar cualquier consumo de oxígeno no derivado de la cadena de transporte de electrones.

Las pendientes de las gráficas así obtenidas, se calcularon utilizando el software del oxígrafo.

I.4.5 Cuantificación del número de copias de mtDNA por RT-PCR

Fundamento: conocemos el número de copias de un gen nuclear (2, en células diploides), pero el número de copias de mtDNA por célula puede ser muy variable. El protocolo se fundamenta en la cuantificación de la cantidad relativa de copias de mtDNA por copia nuclear mediante RT-PCR, a partir de la diferencia de la Ct (del inglés, Cycle threshold) tras la amplificación de un gen mitocondrial (mtCt) y la Ct tras la amplificación de un gen nuclear (nCt). De este modo, el número de copias de mtDNA relativo al número de copias de un gen nuclear será igual a:

$$2^{*(2^{\Delta Ct})}; \text{ donde la } \Delta Ct = nCt - mtCt$$

El ΔCt es inversamente proporcional al número de copias de mtDNA.

Protocolo:

Para llevar a cabo la RT-PCR se utilizó el sistema de lectura de placas de 96 o de 384 pocillos de Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR; y el Kit Power SYBR Green PCR Master Mix de Applied Biosystem.

Para el diseño de los cebadores nucleares se tubo en cuenta que uno de los cebadores de la pareja estuviese situado sobre un exón y el otro sobre un intrón, para evitar la amplificación del transcrito originado al expresarse el gen. También se evaluó la eficiencia de las pareja de cebadores, se realizaron diluciones 1:10 seriadas de un DNA cualquiera (de 10 a 0,001 ng/μl) que fueron utilizadas como molde en las diferentes reacciones (la recta de regresión lineal obtenida era $-3.3 \text{ Log}(x)$)

Preparación de las muestras: en la preparación de la muestra de DNA procedentes de tejidos hay tres factores que se han tenido en cuenta:

- Es conveniente que la extracción de DNA del tejido sea a partir de una muestra homogénea del mismo. Hemos observado que el número de copias de mtDNA en el hígado de ratón varia entre diferentes trocitos cogidos aleatoriamente del mismo hígado.
- Los diferentes métodos de extracción de DNA, solventes orgánicos (phenol-cloroformo-alcohol isoamilico) o columnas de sílice, también influyen en la ratio nDNA-mtDNA obtenido. Solamente se comparan dos muestras donde el DNA haya sido extraído bajo las mismas condiciones.
- La calidad del DNA tiene una influencia directa en la eficiencia de la PCR.

RT-PCR: La reacción llevada a cabo fue la siguiente:

	96 poc	384 poc.
	Vol_r:20μl	Vol_r: 10μl
Supermix	10μl	5μl
Oligo F (10mM)	0,5μl	0,25μl
Oligo Rv (10mM)	0,5μl	0,25μl
DNA (2,5 ng/μl)	3μl	1,5μl
H₂O	6μl	3μl

Cebadores mitocondriales (mtCo2):

COII RTF 3'- CTACAAGACGCCACAT-5' (7037-7052)

COII RTR 3'- GAGGGGGAGAGCAAT-5' (7253-7238)

Cebadores nucleares (SDH):

SDH RTF 3'- TACTACAGCCCCAAGTCT-5' (1026-1043)

SDH RTR 3'- TGGACCCATCTTCTATGC-5' (1219-1202)

Programa: 2min-95°C, (15seg-95°C, 60seg-60°C)x40, curva de disociación.

Para el análisis de datos se utilizó el software SDS v2.3.

I.5. Extracción y genotipado de ovocitos y embriones de ratón

Reactivos:

- Buffer de Lisis de embriones: 50mM Tris-HCl pH8-8.5, 1mM EDTA, 0,5% Tween-20 y 1,25mg/ml de proteinasa K (PK). El stock de proteinasa K (20mg/ml) se conserva a -20°C y se añade fresca antes de su utilización.

I.5.1 Extracción y genotipado de oocitos

Las hembras fueron superovuladas por tratamiento hormonal con 5 UI/hembra de PMSG y, 46-48 horas después, con 5 UI/hembra de HCG. Al día siguiente de la administración de HCG, fueron sacrificadas por dislocación cervical, y se abrió la cavidad abdominal exponiendo los órganos reproductivos tal y como se describe en la *Figura M.5B*. Sujetando el extremo de uno de los cuernos uterinos con un fórceps, se separó el oviducto, ovario y grasa. A continuación se depositó el oviducto en una placa de Petri de 35mm conteniendo medio M2 (comercial) a temperatura ambiente. Los oocitos, rodeados de las células del cumulus, se encuentran en la parte superior del oviducto, en el ampulla, que se desgarró con cuidado con la ayuda de una aguja de 30G. Los ovocitos así obtenidos fueron aspirados con una pipeta de manipulación de embriones y transferidos a una placa de Petri con medio M2 + 0,3mg/ml de hialuronidasa durante un par de minutos, para permitir el desprendimiento de las células del cumulus. Por último se volvieron a transferir los ovocitos a una placa de 35mm con H₂O miliq. Rápidamente (para evitar la lisis) se aspiraron los ovocitos individualmente y se colocaron en el fondo de un tubo de PCR, en un volumen aproximado de 5µl de agua. (En colaboración con la Unidad de Transgénesis del CNIC).

Directamente se añadieron 3µl del Buffer de Lysis de Embriones y se mezcló con unos suaves golpes con el dedo (evitar pipetear la muestra, porque el ovocito se pega con facilidad al plástico de las puntas). Se incubó a 55°C durante 30 minutos seguidos de 10 minutos a 95°C para desactivar la proteinasa K. Se colocaron los tubos de PCR en hielo y se añadió el mix de PCR4276 directamente hasta un volumen final de 25µl. (RFLP4276).

I.5.2 Extracción y genotipado de embriones

Las hembras fueron puestas en cruce con machos BL/6^{C57} y se examinó la presencia de tapón de cópula todas las mañanas hasta su visualización. El día que las hembras presentan este tapón mucoso vaginal se empieza a contabilizar como día 0,5 de gestación.

Extracción y genotipado de embriones de 2,5 días

Se sacrificaron las hembras por dislocación cervical dos días después de la visualización del tapón de cópula. Se abrió la cavidad abdominal y se separó el oviducto junto con el último extremo del útero. Se colocó en una placa de Petri de 35mm con medio M2 a temperatura ambiente. Se obtuvieron los embriones por lavado del infundíbulo con medio M2 tal y como se muestra en la *Figura M.5C*.

Los embriones así obtenidos fueron transferidos individualmente a un tubo de PCR y se siguió el protocolo de igual modo que con ovocitos. La única diferencia es que se añadió 5µl de Buffer de Lisis, y se incubó 1 hora a 55°C.

Extracción y genotipado de embriones de 6,5 días

Se sacrificaron las hembras por dislocación cervical 6 días después de la visualización del tapón de cópula. Se cortaron los cuernos uterinos por debajo del oviducto y se transfirió el útero entero a una placa de Petri de 100mm, con PBS1X estéril, intentando eliminar la mayor cantidad posible de grasa. A este estadio las deciduas aun no están claramente separadas del estroma del endometrio. Con unos fórceps, cada decidua fue separada del útero y colocada en placas de Petri individuales con PBS1X. Se separó la capa muscular con fórceps, y a continuación se diseccionó la decidua hasta exponer el pequeño embrión, desprendiéndolo con ayuda de la punta de las pinzas (Quirós et al., 2012; Shea and Geijsen, 2007).

Cada embrión fue pipeteado individualmente y colocado en el fondo de un eppendorf de 1,5ml en el menor volumen posible. Y se añadieron 20µl de Buffer de Lisis. Se incubó durante dos horas (o O/N) a 55°C seguido de 10 minutos a 95°C. Para la reacción de PCR se usó directamente 4µl de DNA.

Extracción y genotipado de embriones de 13,5 días

A los 13 días de la detección del tapón de cópula, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical y se abrió la cavidad abdominal, exponiendo el útero que se transfirió a PBS1X estéril eliminando la mayor cantidad de grasa posible en el proceso. A continuación, trabajando en una placa de Petri de 100mm cada decidua es transferida a una placa individual. Con cuidado, se rasga la pared muscular que cubre la decidua, a continuación la membrana de Reichert y el saco vitelino, exponiendo el embrión, que todavía está cubierto con la membrana amniótica que hay que separar. Se cogió una muestra de piel del embrión, de la cual se extrajo DNA por un método convencional y se realizó la RFLP4726.

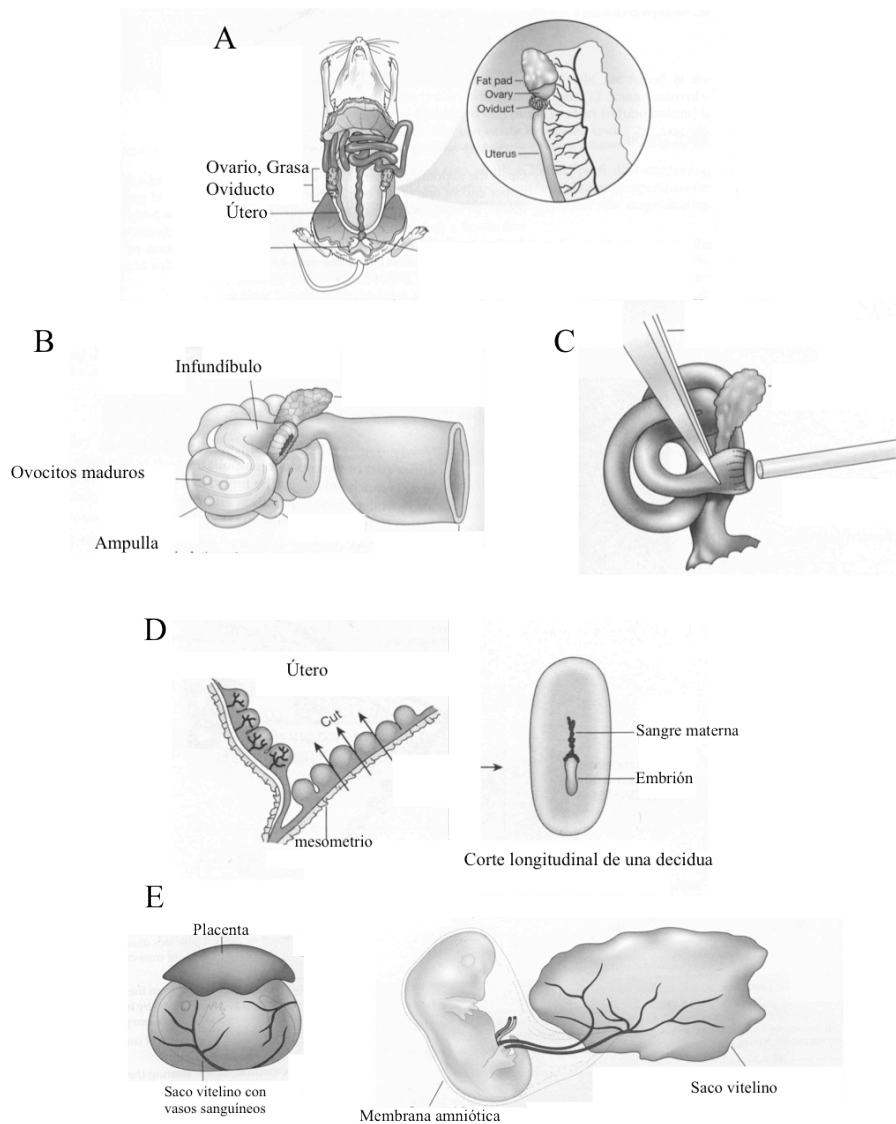


Figura M.5: Esquema de la disección de ovocitos y embriones de ratón. (A) Disección de los órganos reproductivos de una hembra. (B) Aislamiento de ovocitos maduros del ámpula. (C) Lavado del infundíbulo para la obtención de embriones de 2,5 días. (D) Disección de embriones de 6,5 días. (E) Disección de embriones de 13,5 días. *Imágenes tomadas de Manipulating the mouse Embryo, a Laboratory Manual, tercera edición.*

I.6. Procedimientos animales generales

I.6.1 Estudios clínicos

I.6.1.1 Hematología

Se extrajeron sobre 70µl de sangre entera de la vena submaxilar en tubos Microvette® 100EDTA. Todas las muestras siguieron el mismo procedimiento y una vez recogida se

mezclaron inmediatamente por inversión para evitar la formación de coágulos. El análisis hematológico de la sangre entera se realizó el mismo día de la extracción mediante el uso del analizador ABX Pentra 80 que utiliza como métodos de medición, citoquímica, fotometría, impedancia, citometría óptica y de flujo (matriz LMNE).

I.6.1.2 Bioquímica clínica

La extracción de sangre se realizó en animales ayunados O/N a primera hora de la mañana.

Si el animal era sacrificado, se recogieron en torno a 800µl de sangre mediante punción cardíaca (animal previamente sacrificado con CO₂). La sangre fue transferida a un tubo eppendorf (quitando la aguja, para evitar hemólisis) y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 10 minutos a 4500rpm, y el sobrenadante líquido y transparente fue pipeteado a un nuevo tubo eppendorf. Si el análisis no se realizaba el mismo día de la extracción, los sueros se guardaban a -80°C. Todas las muestras de un experimento son sometidas al mismo procedimiento, y analizadas en la misma tanda (para evitar variaciones generadas por la calibración del equipo). Los sueros fueron entregados al servicio de histopatología del CNIC, que analizó el perfil bioquímico solicitado con el aparato Dimension RxL Max.

En el caso de que el animal no fuese sacrificado, la sangre se extrajo de la vena submaxilar y fue recogida en un tubo de Microvette CB300 (hasta un máximo de 300µl, dependiendo del peso del animal y de la frecuencia de extracción)

I.6.1.3 Prueba de Tolerancia a la Glucosa

Los niveles de glucosa en sangre se midieron en una gota de sangre procedente de una pequeña incisión con un bisturí en la cola del animal. El animal se colocó en un cepo para facilitar el manejo. Se usó un glucómetro de mano convencional.

Los animales fueron ayunados O/N. Se pesaron los animales y se midió los niveles de glucosa a tiempo 0. A continuación se inyectó un bolus de glucosa (2g/kg) en la cavidad intraperitoneal usando una aguja 30G. Y se siguió los niveles de glucosa en sangre del animal a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la inyección.

I.6.1.4 Determinación de los niveles de insulina

La determinación de los niveles de insulina en suero se realizó con el kit Rat/Mouse Insuline Elisa de Millipore, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los animales fueron ayunados O/N, y a primera hora de la mañana se pesaron los animales y se midió la glucosa en sangre. A continuación se extrajeron sobre 100µl de sangre entera (en adultos, aprox. 30gr) de la vena submaxilar en tubos eppendorf de 1,5 ml sin anticoagulante. Se dejó la sangre coagular durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó la sangre durante 15 minutos a 2000-3000g a 4°C y se transfirió el suero a un tubo nuevo. Si la medida de insulina no se hacía en el momento, el suero fue guardado a -20°C o -80°C.

Las muestras se evaluaron por triplicado, y las concentraciones de insulina fueron determinadas comparando la absorbancia de la medida de los estándares (curva estándar).

El cálculo del índice HOMA (Homeostasis Model Assessment) se realizó en base a la siguiente fórmula (valores de insulina y glucosa en ayunas):

$$\text{HOMA} = (\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa (mmol/L)}) / 22,5$$

I.6.1.5 Histología

Las muestras de tejido hepático se fijaron en PFA 4% toda la noche. Al día siguiente las muestras se deshidrataron en soluciones de etanol en porcentajes crecientes y finalmente en xilol. Una vez deshidratadas se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados de 5µm en el micrótom.

Para evaluar las lesiones hepáticas se llevó a cabo la tinción con hematoxilina-eosina que se realizó en el sistema Leica Multistainer. Las muestras se montaron y se visualizaron en un microscopio Nikon 90i. Posteriormente se digitalizaron los portas mediante el uso del Digital scanner NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu). Y se usó el software NDP view 2, para el procesamiento de imágenes.

I.6.2 Dietas y administración de drogas

I.6.2.1 Tratamiento con DCA y NAC en agua de bebida

La administración de DCA y NAC a los ratones fue a través del agua de bebida. Los biberones se cambiaron dos veces por semana durante el transcurso del tratamiento.

El DCA, (Sodium dichloroacetate, Sigma-Aldrich) se administró a una concentración de 66,2mM (1% g/vol).

El NAC (N-Acetyl-L-cysteine, Sigma-Aldrich) se administró a una concentración de 61,2 mM (1% g/vol).

I.6.2.2 Administración de Dieta grasa

La dieta de mantenimiento de los ratones ha sido 5K67 LabDiet®. Para los experimentos con dieta con alto contenido de grasa se utilizó D12492 Open Source Diets® (Tabla M.3)

Dieta	Proteínas Kcal%	Grasa Kcal%	Carbohidratos Kcal%	Total Kcal/gm
5K67 LabDiet®	22,382	16,028	61,734	4,17
D12492 Open Source Diets®	20	60	20	5,24

Tabla M.3: Composición de la dieta de los ratones

I.7. High Throughput Screening

I.7.1 RNAseq

Preparación de muestras:

Las muestras proceden de ratones macho, no ayunados, de 10 semanas de edad, fueron recogidas entre las 8:00 y 9:30h de la mañana.

Los ratones fueron sacrificados con CO₂. Se recogió el lóbulo mediano del hígado y el ventrículo izquierdo del corazón, que fueron sometidos a una congelación rápida con nitrógeno líquido. Las muestras de tejido fueron guardadas a -80°C hasta su procesamiento.

La extracción de RNA se realizó mediante una combinación de Trizol Reagent y RNeasy Mini Kit Qiagen. Se homogenizaron 100mg de tejido usando 1ml de Trizol con el Ultra Turrax (en frío). Se dejó incubando el homogenado a t^a ambiente durante 5 minutos. Se añadieron 0,2 ml de cloroformo por cada 1ml de trizol, y se agitó vigorosamente por inversión. Tras dos minutos de incubación a t^a ambiente, se centrifugaron las muestras a 12.000g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se limpió con las columnas del kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se diluyó en 100µl de agua libre de RNasas y se guardó en frío. Se transfirieron 5µl a un eppendrof limpio que fueron usados para evaluar la calidad y cuantificación de las muestras de RNA individuales, por (i)

espectrofotometría (spectrophotometer ND100, Nanodrop®) se evaluó la concentración y la pureza mediante la ratio de la absorbancia a 260/280 y 260/230; y (ii) en un gel de agarosa al 1% TAE teñido con Bromuro se evaluó la calidad, la intensidad de la banda correspondiente al 28S rRNA en torno al doble de intensidad de la banda correspondiente al 18S rRNA.

Se realizaron *pools* de RNA procedentes de muestras de 4 ratones. Cantidades iguales de RNA fueron mezcladas para obtener una concentración de 1,5µg RNA/100µl de H₂O libre de RNasas.

Una vez preparadas las muestras definitivas de RNA, se corrieron las muestras en el Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer: el valor del RNA integrity number (RIN) tiene que ser mayor o igual a 8. (La pureza e integridad del RNA se considera un punto crítico en este protocolo).

Secuenciación de RNA:

La secuenciación de las muestras de RNA-se llevo a cabo en la Unidad de Genómica del CNIC, mediante el uso del secuenciador Illumina Genome Analyzer IIx. A modo de resumen, el protocolo consiste en la preparación de las librerías de secuenciación usando el kit de Illumina basado en enriquecimiento de transcritos con colas poliA, control de la calidad de las librerías, cuantificación de las librerías y carrera de secuenciación.

Las muestras de los hígados de los ratones BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} se corrieron usando un protocolo de secuenciación pareada 2*75 bp (es decir, cada molécula se lee por los dos extremos y los *reads* tienen una longitud de 75bp). Para el resto de muestras se utilizó un protocolo de secuenciación simple de 1*75bp (cada molécula se lee sólo por un extremo).

Procesamiento de datos:

El análisis de datos de NGS fue realizado en la Unidad de Bioinformática del CNIC. El proceso comprende (i) un control de calidad con FASTQC de los datos crudos, (ii) la detección y limpieza de contaminantes usando el software cutadapt, (iii) alineamiento de las reads al transcriptoma (basado en la referencia de Ensembl GRCm38, gene build 70) y cuantificación usando RSEM, (iv) y el análisis de expresión diferencial usando el paquete de R EdgeR. En este análisis se filtraron transcritos con niveles de expresión por debajo de una cuenta por millón de reads secuenciadas, se normalizaron las réplicas usando el método TMM de EdgeR y se evaluó la significancia ajustando para múltiples tests.

Interpretación de resultados:

La interpretación del significado biológico de los resultados se realizó mediante el uso del Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>), y Gen Set Enrichment Analysis (GSEA) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>).

I.7.2 Metabolómica

La identificación del perfil metabólico fue realizada por la empresa Metabolon.

Preparación de muestras:

Las muestras proceden de un total de 24 animales de 10 semanas de edad, recolectadas entre las 8:00-9:30h de la mañana de animales no ayunados: 6 machos BL/6^{C57}, 6 machos BL/6^{NZB}, 6 hembras BL/6^{C57} y 6 hembras BL/6^{NZB}.

Se prepararon las muestras de hígado y plasma de acuerdo a las especificaciones recomendadas.

Plasma: se extrajeron en torno a 700-900µl de sangre por punción cardiaca (animales sacrificados con CO₂). La sangre fue depositada con cuidado en un eppendorf de 2ml (quitando la aguja, para evitar hemólisis) y se añadió el mismo volumen de 9mM EDTA en PBS1X (para conseguir una concentración final aproximada de EDTA de 4,5mM). Se mezcló bien por inversión, y se centrifugó a 1000xg durante 15 minutos. El sobrenadante claro, se transfirió a los tubos proporcionados por Metabolon y se sometieron a una congelación rápida en nitrógeno líquido.

Hígado: Se recogió una muestra de hígado de 50-100mg procedente del lóbulo izquierdo del hígado y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido.

Las muestras se guardaron a -80°C hasta su envío en hielo seco a Metabolon.

Procesamiento de muestras:

El análisis de los metabolitos fue realizado por la empresa Metabolon. La identificación de los metabolitos se realizó mediante Cromatografía de gases/Espectometría de masas (GC/MS) y Cromatografía líquida/Espectometría de masas (LC/MS). Fue proporcionado un archivo Excel con los datos crudos conteniendo la información de los parámetros de todos los compuestos (identificadores, masa, índice de retención, etc.). En total se identificaron 313 metabolitos en hígado y 287 en plasma.

Análisis de datos:

Se realizó un análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de los 197 metabolitos comunes de ambas matrices (plasma e hígado), y de cada matriz (313 metabolitos en el hígado y 287 metabolitos en plasma).

La significación biológica de los cambios se evaluó haciendo uso del Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>), y Metabolite Set Enrichment Analysis (MSEA).

I.7.3 Cuantificación por FISH de la longitud telomérica

Se midió la longitud telomérica en muestras de piel de la cola por medio de una hibridación fluorescente in situ cuantitativa (Q-FISH), en colaboración con el grupo del Dr. D. Ignacio Flores del CNIC.

Preparación de las muestras:

Se cortó 1cm de cola de los ratones con un bisturí cauterizador. Para minimizar el estrés y dolor de los ratones, estos fueron anestesiados con Isoflurano, y se les inyectó el analgésico Buprenorfina por vía SC tras el procedimiento. El trozo de cola se depositó en PBS1X en frío.

Para sacar el hueso de la cola, se realizó un corte longitudinal con un bisturí y con unas pinzas se cogió el extremo del hueso y se empujó hasta sacarlo. Se estiró la piel obteniendo un rectángulo, y se colocó lo más aplanada posible sobre un trocito de papel Whatman (la zona del pelo hacia arriba). Se fijó O/N en PFA al 4%. Los tejidos fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes seriados de 7µm. Uno de los cortes se tiñó con HE. El resto se utilizó para FISH.

Hibridación in situ cuantitativa (Q-FISH):

Los cortes fueron hibridados con la sonda PNA marcada con Cy3 con la repetición de la secuencia telomérica, tal y como ha sido descrito (González-Suárez et al., 2000; Herrera et al., 1999; Zijlmans et al., 1997). La señal de DAPI y Cy3 se adquirieron en canales separados con un objetivo de 60x aumentos usando un microscopio confocal (Laica SP5). Todas las tinciones fueron realizadas a la vez. En la adquisición de imágenes se mantuvo la misma intensidad de los láseres para minimizar la variación entre días. Las imágenes para la cuantificación fueron generadas a partir de proyecciones de máxima intensidad de imágenes apiladas de 12-bit (15 secciones por stack de 1µm). Las imágenes de DAPI fueron ajustadas y segmentadas usando el

ImageJ. Para el análisis cuantitativo de imágenes se usó el Metamorph platform (Molecular Devices), tal y como se ha descrito (Flores et al., 2008).

Análisis estadístico:

Tan solo las células de la protuberancia del folículo piloso fueron consideradas para el análisis. Los valores de la intensidad de los telómeros fueron exportados al Excel.

Para calcular la significancia estadística entre la distribución de la longitud telomérica se utilizó el test Wilcoxon's rank sum. Para comparar la reducción media de la longitud telomérica y el porcentaje de telómeros cortos y largos se utilizó un two-tailed T-test.

II. Material y Métodos: Cultivos celulares

Las técnicas y procedimientos rutinarias del cultivo celular se recogen detalladamente en previas tesis presentadas en el grupo.

II.1. Medios de cultivo

Medio de Fibroblastos

Medio DMEM (Sigma D5796) con alto contenido en glucosa (4,5g/l) y L-glutamina suplementado con el 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma), 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza) y 1mM de piruvato de sodio.

Medio de Fibroblastos modificado

Medio DMEM (Gibco, 11966-025) sin glucosa, suplementado con 10% SFB (Sigma), 1% penicilina/estreptomicina (Lonza) y 1mM de piruvato de sodio. Las diferentes fuentes de carbono que se han utilizado son:

0,9g/L Glucosa (Sigma)

0,9g/L Galactosa (Sigma)

En ensayos específicos se añadieron los compuestos requeridos, N-acetil-L-cisteína 1mM (Sigma) y Dicloroacetato de Sodio 15mM (Sigma).

Todos estos compuestos se disolvieron en H₂O miliq y fueron filtrados (0,22µm) antes de su utilización.

Medio de ES

Medio DMEM con Glutamax-I (Gibco, 61965-026) con alto contenido en glucosa (4,5g/l) suplementado con el 15% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma), 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza), 1mM Piruvato de Sodio, 0.7% β-mercaptoetanol (Sigma), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco), y 1000 U/ml de LIF (Chemicon Internacional LIF2010).

II.2. Fibroblastos Embrionarios de ratón (MEFs)

II.2.1 Preparación de MEFs

Los MEFs se prepararon a partir de embriones de día 12.5-14.5 d.p.c. Una vez extraído el útero se trabajó bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

Los embriones fueron diseccionados del útero individualmente y colocados en una placa de Petri con PBS 1X donde se desecharon la cabeza, extremidades, cola, y órganos internos (hígado, corazón...). Se lavó la carcasa varias veces con PBS 1X para quitarnos la mayor cantidad posible de sangre, y se troceó con tijeras estériles en un volumen de 800µl de PBS 1X. Tras lo cual se colocó en un Falcon de 15ml y se añadió 5ml de Tripsina 0,1% y se incubó 30 minutos a 37°C con agitación.

Se transfirió la suspensión celular a un nuevo tubo (evitando coger los trozos más grandes que no habían sido disgregados), y se centrifugó durante 3 minutos a 1000 rpm. Se resuspendió las células en medio de cultivo de fibroblastos y se pasaron a placas de 100mm. Un embrión en 2 placas de 100mm.

Se cambió el medio a las 24 horas, y a las 48-72 horas, cuando el cultivo llegó a un 90% de confluencia, los MEFs fueron usados directamente para experimentos, o se congelaron indicando pasaje 1.

II.2.2 Inmortalización de MEFs

Los MEFs han sido inmortalizados con retrovirus que contenían los oncogenes E6/E7 del papilomavirus humano tipo 16, con el gen que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa, cedido por el laboratorio de la Dra. Wartiovaara.

Para la infección retroviral, las células se sembraron en placas de 60mm y se esperó a tener una confluencia del 80%. Se quitó el medio de las células y se añadió 1,1ml de medio de fibroblasto con Polibreno (4µg/ml) y 0,4ml del stock de virus filtrado (aprox. 10⁵IU/ml). Se incubó a 37°C durante 2 horas, tras las cuales se añadió 5ml más de medio con Polibreno (4µg/ml) y se siguió incubando 5 horas más a 37°C. Transcurrido ese tiempo se quitó el medio con virus, se lavó un par de veces con medio fresco, y se añadió 5 ml de medio fresco sin polibreno.

Al día siguiente se cambió el medio por el medio de selección que contenía 400µg/ml de G418. Durante los 7-10 días que duró la selección antibiótica se cambio el medio cada 2 días.

Durante este proceso todos los objetos y medios de cultivo que habían estado en contacto con virus, se recogían y desinfectaban con hipoclorito al 10%. Después de la desinfección todo el material era autoclavado.

II.3. Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSCs)

II.3.1 Generación de iPSC

La generación de iPSC se realizó a partir de MEFs en pasaje 1-2 mediante la transfección de los factores de reprogramación (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) con el sistema inducible por doxiciclina PiggyBac Transposón; en colaboración con el grupo de la Dra. Wartiovaara, siguiendo el protocolo ya descrito (Woltjen et al., 2011; 2009).

Se utilizaron tres vectores (*Figura M.6*):

- PB-TET-MKOS transposón. Contiene los cuatro factores de reprogramación y el reportero d la β-galactosidasa.
- PB-CA-rtTA transposón. Expresa el rtTA transactivador dependiente de doxiciclina.
- pCyL43 transposasa. Expresa constitutivamente la transposasa piggyBac.

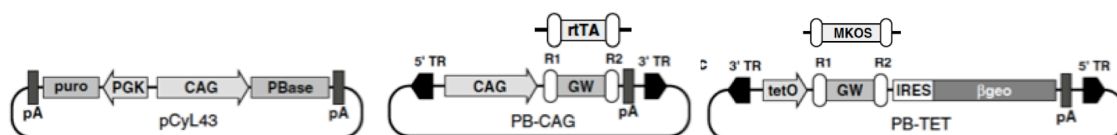


Figura M.6: Vectores transposón piggyBac utilizados para generar iPSCs. Imagen tomada de (Woltjen, *Methods Mol Biol*, 2011).

El método de transfección utilizado fue el de “Neon® Transfection System” de Invitrogen, junto con el Kit de la misma compañía “Neon™ Transfection System 100µl Kit”.

Los MEFs fueron tripsinizados y lavados una vez con PBS 1X. Tras contar las células se resuspendieron 250.000 células en 125µl de buffer R (Neon Kit) y se añadieron 2µg de los vectores (1000ng del vector PB-TET-MKOS, 500ng del PB-CA-rtTA y 500ng del pCyL43). La electroporación se llevó a cabo usando puntas Neon de 100µl a 1300V, 30 ms, 1 pulso.

Las células electroporadas se pasaron directamente en dos pocillos de una placa de 6 pocillos previamente tratada con gelatina con medio de fibroblastos sin antibióticos. Al día siguiente se cambió el medio por medio de ES suplementado con doxiciclina a una concentración de 1,5µg/ml. Durante los siete días siguiente se renovó el medio diariamente. A los cinco días ya se empiezan a ver los típicos foci que formaran las colonia de iPSC, que estarán listas para ser recogidas transcurridos 8 días tras la electroporación.

Para picar las colonias, se lavó el pocillo una vez con PBS 1X y se añadió 1ml de PBS 1X. Las colonias se picaron bajo una lupa, con la punta de la pipeta se desprendió la colonia recogiéndola en 20µl de PBS1X, y se colocó en una gota de 20µl de Trispsina 2X y se dejó durante un par de minutos. Luego se transfirieron a una placa de 96 pocillos (una colonia por pocillo) con *feeders*.

El cultivo de iPSC se realizó con medio de ES.

II.3.2 Caracterización de células pluripotentes inducidas (iPSCs)

Determinación de la Actividad Fosfatasa Alcalina

La determinación de la actividad de la Fosfatasa Alcalina (AP) en las iPSC se realizó aprovechando la reacción NBT/BCIP, en la cual el BCIP es desfosforilado por la actividad de la AP, y posteriormente oxidado por el NBT. Tanto la oxidación del BCIP desfosforilado, como la reducción del NBT dan un precipitado de color azul-violeta. De este modo las células positivas se tiñen de una color azulado.

Las células, sembradas en una placa de 6 pocillos, se lavaron dos veces con PBS 1X. A cada pocillo se añadió 1 ml de la siguiente solución (fresca): 100mM Tris-HCl pH8,8, 10mM NaCl, 50mM MgCl₂ y 2% (vol/vol) de NBT/BCIP (Stock solution, Roche). Se incubó 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, y se lavó 3 veces con PBS 1X.

Inmunofluorescencia

Las células fueron fijadas sobre cubreobjetos con PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS 1X se bloquearon y permeabilizaron con 0,1% Triton-X100, 10% suero de cerdo, durante 30 minutos a temperatura ambiente y se volvió a lavar tres veces con PBS 1X.

Se incubó con los anticuerpos primarios SSEA1 (Millipore) 1:100 y Nanog (abcam) 1:500, diluidos en el diluyente comercial “Dako REAL™ (DAKO) durante 2 horas a temperatura ambiente (o a 4°C O/N).

Se lavó tres veces con 1% de suero porcino en PBS 1X; y se incubó con los anticuerpos secundarios de la casa comercial de abcam Anti-Rabbit Alexa Fluor® 594 (ab 150076) y Anti-Mouse Alexa Fluor® 488 (ab 150105) diluidos 1:500 respectivamente en el diluyente de anticuerpos comercial “Background Reducing” (DAKO), durante una hora a temperatura ambiente.

Por último se lavó tres veces con 1% de suero porcino en PBS 1X, y se montaron los cubres con el kit “SlowFade Antifade” de Invitrogen.

RT-qPCR

Para el aislamiento del ARN total de células se usó el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se resuspendió en agua libre de ribonucleasas, se cuantificó por espectrofotometría (spectrophotometer ND1000, Nanodrop®) y se comprobó su pureza y calidad mediante electroforesis en gel de agarosa.

Las muestras de ARN total se trataron con el kit RQ1 Rnase-free Dnase (Promega), según instrucciones del fabricante, para eliminar el ADN de la muestra.

La retrotranscripción (RT) a ADNc se realizó a partir de 1µg de ARN total con el kit “Maxima First Strand cDNA Synthesis kit for RT-qPCR” (Fermentas), siguiendo las especificaciones del fabricante.

El análisis cuantitativo de la expresión génica se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) en sistemas de Detección de Secuencia (SDS) 7900FAST de Applied Biosystems. Para la reacción se utilizó SYBR Green I Dye (SYBR Green master Mix 2X, Applied Biosystems). Los datos fueron analizados con el programa de análisis SDS por el método de la cuantificación relativa por comparación de C_T (*threshold cycle* umbral de detección establecido).

Se cuantifico la expresión génica de los genes Oct4, Rex1, Nanog, Dnmt3b y Sox. Para la normalización se utilizó el gen GAPDH. En cada carrera se incluyó muestras de fibroblastos como control negativo. (*Tabla M.5*)

Gen	Oligo	Secuencia (5'-3')	Ensayo
Oct4	mOct4 F	CCAACGAGAAGAGTATGAGGC	qPCR
	mOct4 R	CAAAATGATGAGTGACAGACAGG	
Rex1	mRex1 F	GGAAGAAATGCTGAAGGTGGAGAC	qPCR
	mRex1 R	AGTCCCCATCCCCTTCAATAGC	
Nanog	mNanog F	CCTCCAGCAGATGCAAGAA	qPCR
	mNanog R	GCTTGCACTTCATCCTTTGG	
Dnmt3b	mDnmt3b F	AGATGATGGGAATGGCTCTG	qPCR
	mDnmt3b R	AGACCTGGTAGCCGGAAACT	
Sox2	mSox2 F	TCTGTGGTCAAGTCCGAGGC	qPCR
	mSox2 R	TTCTCCGTTTCGCAGTCCAG	
GAPDH	mGAPDH F	ACCACAGTCCATGCCATCAC	qPCR
	mGAPDH R	ACCACAGTCCATGCCATCAC	

Tabla M.5. Secuencias de oligos utilizados para la caracterización de la pluripotencia e iPSC

Tinción LacZ

Las iPSCs fueron crecidas en presencia y ausencia de doxiciclina por lo menos durante dos pasajes.

Las células se lavaron un par de veces con PBS 1X y se fijaron con Glutaraldehído 0,02% a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se lavaron tres veces con PBS 1X. Finalmente las células se tiñen con la solución de revelado (1mg/ml X-Gal, ferrocianuro potásico 5mM y ferrocianato potásico 5mM en PBS 1X) a 37°C durante 2-16 horas. Tras la tinción las células se lavaron dos veces con PBS 1X.

Resultados

I. Generación de modelos animales

Los tres principales modelos de ratón generados y utilizados en el transcurso de esta tesis doctoral han sido: ratones conplásticos, ratones heteroplásmicos y ratones quiméricos (Figura I.1).

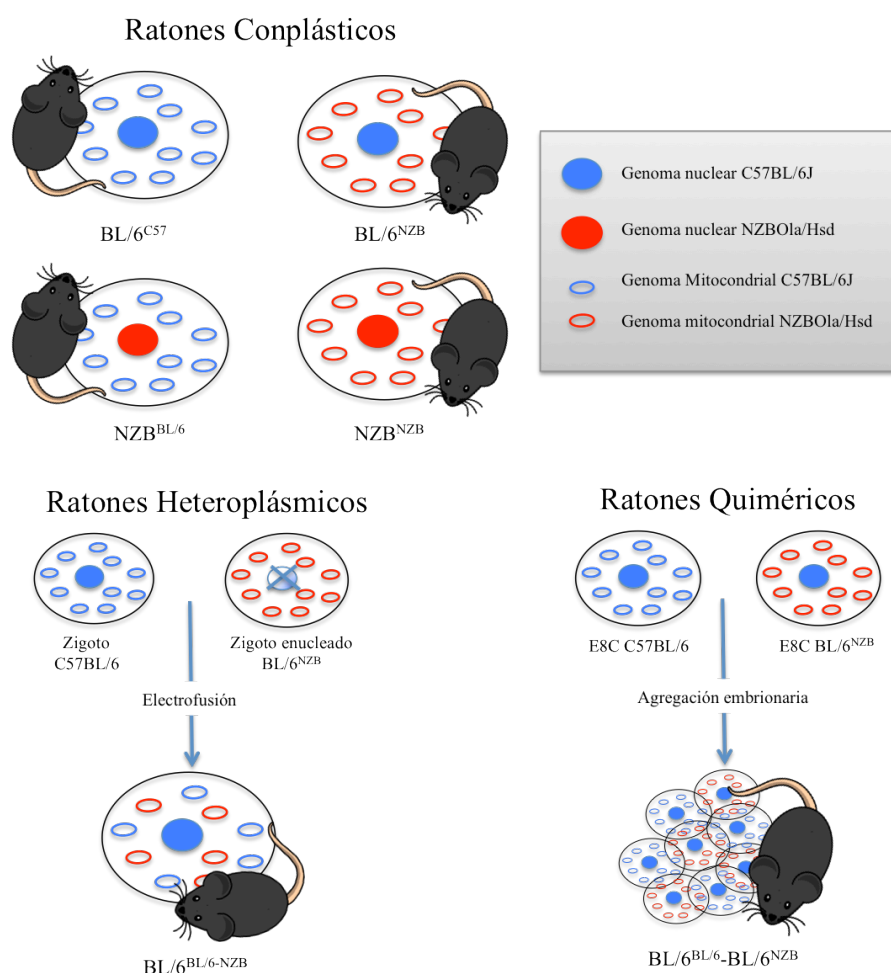


Figura I.1: Modelos animales. Representación esquemática de los modelos animales generados y utilizados durante el desarrollo de la tesis doctoral con la nomenclatura utilizada.

I.1. Ratones conplásticos

Los ratones conplásticos se caracterizan por tener el mismo fondo genético nuclear, pero diferente mtDNA (<http://research.jax.org/grs/type/conplastic.html>). Se podría decir que son la equivalencia *in vivo* del modelo *in vitro* de los híbridos transmitocondriales. Por ello, con el

objetivo de determinar si los haplotipos de mtDNA C57BL/6J y NZBOLA/Hsd generan diferencias funcionales *in vivo*, se generaron ratones conplásticos (*ver material y métodos*).

Teniendo en cuenta la herencia exclusivamente materna del mtDNA, se generaron líneas conplásticas mediante el retrocruzamiento de ratones consanguíneos C57BL/6J (BL/6^{C57}) y NZBOLA/Hsd (NZB^{NZB}) durante un mínimo de 10 generaciones. Se estableció una línea con fondo nuclear C57BL/6J y el mtDNA NZBOLA/Hsd (BL/6^{NZB}), y una segunda línea con fondo nuclear NZBOLA/Hsd y mtDNA C57BL/6J (NZB^{BL/6}). Las crías obtenidas tras 10 generaciones son consideradas conplásticas y son mantenidas mediante el cruce de las hembras conplásticas, donadoras del mtDNA, con los machos de la línea consanguínea receptora.

Debido a que la obtención de ratones conplásticos es mediante retrocruzamiento, se estimó la pureza nuclear mediante tres aproximaciones complementarias (*Figura I.2*):

(i) Se determinaron por RFLP 20 polimorfismos particulares de las líneas C57BL/6 y NZBOLA/Hsd localizados en cromosomas distintos.

(ii) Se usó el “Affimetrix® Mouse Diversity Genotyping Array” que examina 632.000 SNPs, cubriendo todo el genoma con una resolución de mapeo de 4.3 kb.

(iii) Se realizó análisis de RNAseq de hígado y corazón de estos animales, y se compararon las secuencias consenso expresadas, tanto para los genes codificados por el mtDNA como nDNA, determinando la probabilidad de identidad de estas secuencias.

Las tres aproximaciones demostraron que el genoma nuclear no es distinguible entre las líneas conplásticas.

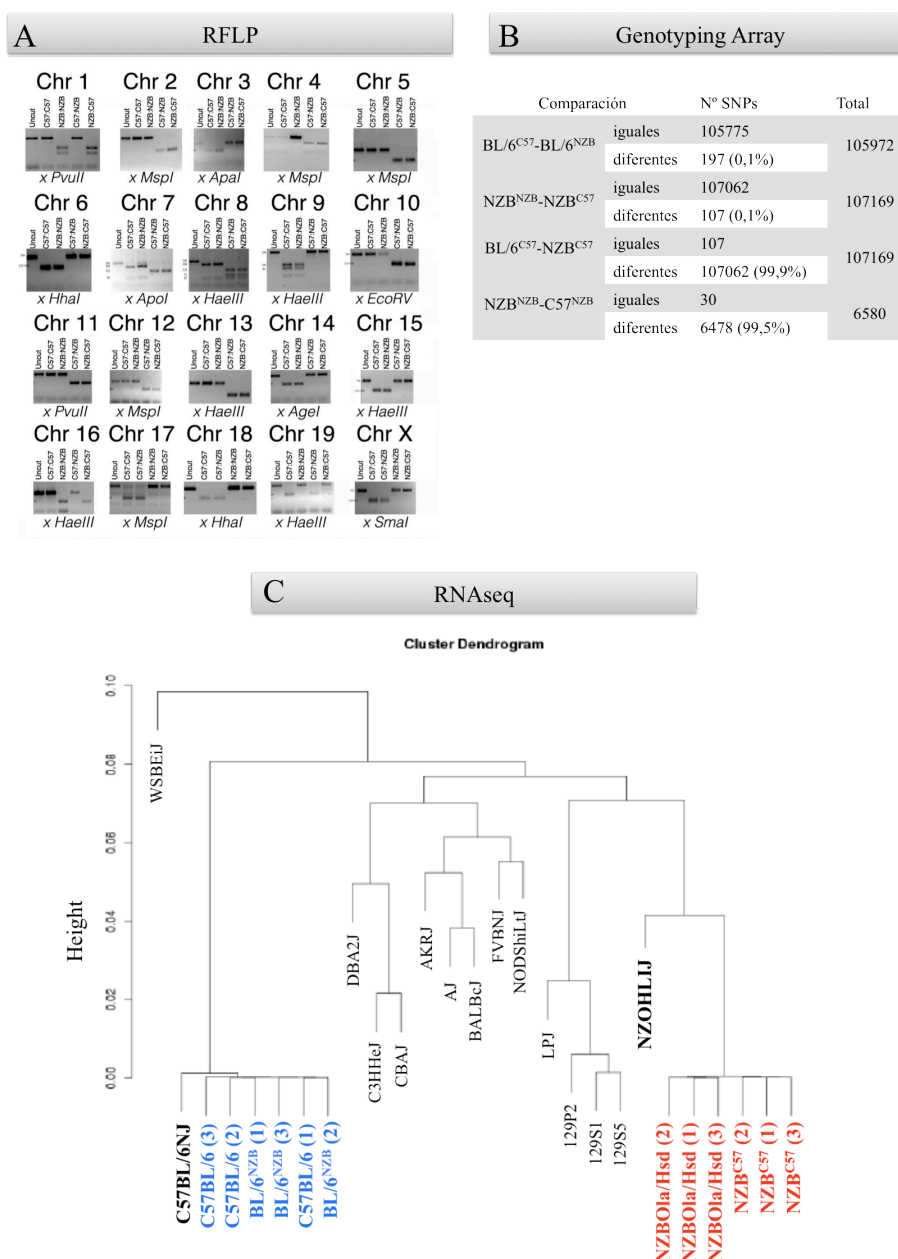


Figura I.3: Evaluación de la pureza nuclear entre los ratones conplásticos BL/6^{C57}, BL/6^{NZB}, NZB^{NZB}, NZB^{C57}. (A) RFLP: Análisis de las variaciones de 20 polimorfismos nucleares por RFLP. Cada uno de ellos localizados en cromosomas distintos. BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} presentan el mismo patrón de corte, y NZB^{NZB} y NZB^{C57} el opuesto. (B) “Affimetrix® Mouse Diversity Genotyping Array”: comparación de cada línea con los SNPs homocigotos opuestos en las líneas parentales. Las líneas BL/6^{C57} con BL/6^{NZB} y NZB^{NZB} con NZB^{C57} son muy semejantes entre sí, diferenciándose únicamente en un 0,1% de los SNPs homocigotos de las líneas parentales originales. (C) RNAseq: comparación de la secuencias consenso expresadas en hígado y corazón para los genes codificados por el nDNA, y determinación la probabilidad de identidad de estas secuencias. Árbol dendrograma junto con la secuencia del exoma de 15 estirpes de ratón.

I.2 Ratones heteroplásmicos

Los ratones heteroplásmicos son aquellos que presentan dos formas alélicas del mtDNA conviviendo en la misma célula. El grupo de investigación del Dr. Shoubridge en la Universidad de Montreal, es el pionero en la generación de este tipo de ratones (ratones Balb/c^{Balb/c-NZB}) (Jenuth et al., 1997). En el año 2012, el grupo del Dr. Wallace corroboró el fenómeno de segregación selectiva del mtDNA tras la generación de ratones heteroplásmicos C57BL/6^{129-NZB} (Sharples et al., 2012).

En nuestro laboratorio se generaron ratones heteroplásmicos con fondo nuclear C57BL/6J y contenido de mtDNA C57BL/6J y NZBOLA/Hsd. Estos ratones proceden de la electrofusión de cigotos BL/6^{C57} con cigotos conplásticos BL/6^{NZB} previamente enucleados (*ver material y métodos*). Respecto a trabajos anteriores, desde un punto de vista metodológico, la novedad no solamente radica en el fondo genético nuclear y mitocondrial utilizado, sino que además los cigotos electrofusionados en este procedimiento provienen de ratones conplásticos BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} y, por tanto, ambos mtDNAs han coexistido previamente en el mismo fondo nuclear (C57BL/6) descartando así posibles incompatibilidades entre el nDNA y mtDNA.

En dos experimentos de enucleación-electrofusión paralelos se obtuvieron 9 animales heteroplásmicos BL/6^{BL/6-NZB} con niveles de mtDNA NZB en cola comprendidos entre 9 y 67%. Las cuatro hembras obtenidas fueron usadas como reproductoras y fundadoras de la colonia mediante cruces continuos con machos C57BL/6J, y los niveles de heteroplasmia de todos los ratones obtenidos fueron analizados mediante la RFLP4276 (*ver material y métodos*).

Con el objetivo de evaluar posibles factores implicados en la segregación del mtDNA, se generaron los ratones heteroplásmicos OMA1^{-/-} (*ver material y métodos*).

I.3 Ratones quiméricos mitocondriales

Los ratones quiméricos mitocondriales se caracterizan por contener dos formas alélicas del mtDNA, pero, a diferencia de los ratones heteroplásmicos, las variantes de mtDNA están individualizadas en diferentes células; es decir, las células presentan una condición homoplásmica y los mtDNAs no se pueden confrontar entre sí. Hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio en el cual se haga uso de este tipo de modelos animales.

Mediante la agregación de embriones de 8 células (E8C) BL/6^{C57} con E8C BL/6^{NZB} se generaron ratones quiméricos mitocondriales con un fondo genético nuclear C57BL/6 y con el mtDNA C57BL/6 y NZB (*ver material y métodos*). Como el genoma nuclear de las células que

componen la quimera es idéntico, el quimerismo ha sido evaluado mediante la contribución de cada variante de mtDNA, con la RFLP 4276.

Las quimeras mitocondriales sólo se pueden obtener mediante la agregación de embriones; ya que el ovocito (una sola célula) tiene normalmente condición homoplásmica.

I.4 Características de los modelos animales

En la primera década del 2000 aparecieron los primeros estudios con animales conplásticos (Roubertoux et al., 2003), principalmente por el grupo del Dr. Ibrahim de la Universidad de Rostock (Alemania), que generaron más de 16 líneas de ratones conplásticos en un fondo nuclear C57BL/6J (Yu et al., 2009). También se han desarrollado algunos estudios con ratas conplásticas (Houštek et al., 2012; Kumarasamy et al., 2013; 2010). Uno de los problemas mas importantes de esos estudios es la falta sistemática del análisis de la pureza nuclear. Recientemente se ha propuesto subsanar esta dificultad mediante técnicas de transferencia nuclear en oocitos de ratón (Fetterman et al., 2013). Propuesta que, como veremos mas adelante en este trabajo, presenta el riesgo de quimerismo mitocondrial. Como novedad en nuestro trabajo, evaluamos por primera vez, por medio de análisis genéticos, la pureza nuclear de los ratones conplásticos y también hemos generado los ratones conplásticos en ambas direcciones, es decir, en ambos contextos nucleares.

Con los análisis realizados podemos afirmar que las únicas diferencias a nivel génico existentes entre los ratones BL/6^{C57}, BL/6^{NZB}, BL/6^{C57-NZB} y BL/6^{C57}-BL/6^{NZB}, y entre los ratones NZB^{NZB} y NZB^{C57}; se encuentran en el genoma mitocondrial.

Las secuencias de mtDNA C57BL/6 y NZB difieren entre si en 91 nucleótidos. De los cuales 14 provocan un cambio de aminoácido: 12 localizados en seis de las siete proteínas mitocondriales del Complejo I, un cambio en Cyt b, y un cambio en la proteína del complejo IV mt-CoI. Además existen diferencias en 4 de los 22 tRNAs mitocondriales (Fenilalanina, Cisteína, Glicina y Arginina); y en el gen que codifica para el rRNA 16S. Por último, existen seis diferencias en la secuencia de la región de 1000pb denominada bucle de desplazamiento (D-loop) (*Figura I.4*).

mRNA: aa changes				tRNA			D-loop		
Gene Name	mtDNA position	Change	aa gchange	tRNA	mtDNA position	change	D-loop	mtDNA position	change
mt-Nd1	2766	A/G	Ile/Ala	mt-Tf	55	A/G	mt-Dcr	15499	T/A
	2767	T/C	Ile/Ala	mt-Tc	5205	insG		15549	C/T
	2934	C/T	Arg/His	mt-Tg	9391	A/G		15578	A/T
mt-Nd2	3932	G/A	Ala/Thr	mt-Tr	9821	insAA		15588	C/T
	4706	A/G	Ile/Val					15603	C/T
mt-Nd4l	9985	G/A	Val/Met	rRNA				15657	T/C
mt-Nd4	10952	C/A	Ile/Met	rRNA	mtDNA position	change		15917	C/T
mt-Nd5	12835	T/C	Ile/Thr					mt-Rnr2	1353
	13444	C/T	Thr/Ile	1519	G/A	16268			A/G
mt-Nd6	13689	C/T	Val-Leu/Ile		1590	G/A			16272
					13781	A/G	Ile/Ala		1822
	13782	T/C	Ile/Ala	2201	T/C				
mt-Cytb	14211	G/A	Ala/thr	2340	G/A				
mt-Co1	5463	G/A	Ala/Thr	2525	C/T				

Figura I.4: Diferencias entre el mtDNA C57BL/6 y el mtDNA NZB. Según las secuencias de referencia publicadas del mtDNA de C57BL/6J (NC_005089) y NZB/B1NJ (L07095). Las diferencias localizadas en el RNA mensajero (mRNA) han sido validadas con los resultados de RNAseq.

Figura I.4: Diferencias entre el mtDNA C57BL/6 y el mtDNA NZB. Según las secuencias de referencia publicadas del mtDNA de C57BL/6J (NC_005089) y NZB/B1NJ (L07095). Las diferencias localizadas en el RNA mensajero (mRNA) han sido validadas con los resultados de RNAseq.

II. Implicaciones fenotípicas de las variantes del DNA mitocondrial

II.A Implicaciones fenotípicas de las variantes de mtDNA *in vivo* en animales jóvenes

IIA.1. Evaluación de la función mitocondrial

Teniendo en cuenta los antecedentes (*ver antecedentes y objetivos*) la primera pregunta a responder fue: ¿Son las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB neutrales *in vivo*? (Battersby and Shoubridge, 2001); o por el contrario ¿Las diferencias funcionales descritas en híbridos mitocondriales son relevantes *in vivo*? (Moreno-Loshuertos et al., 2006).

En un trabajo publicado en 2001 por el grupo del Dr. Shoubridge describen que no existían diferencias en la capacidad respiratoria entre mitocondrias aisladas de hígados provenientes de ratones heteroplásmicos Balb/c^{Balb/c-NZB} con alto (91-97%) y bajo (0%) contenido de mtDNA NZB respectivamente (Battersby and Shoubridge, 2001), concluyendo que las variantes de mtDNA Balb/c y NZB no promueven diferencias funcionales *in vivo*. Por ello, el primer experimento que realizamos fue medir el consumo de oxígeno y producción de ATP usando diferentes sustratos (piruvato/malato, glutamato/malato y succinato) en mitocondrias aisladas de hígados provenientes de ratones conplásticos de 8 semanas de edad: BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} (Figura II.1). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la capacidad respiratoria mitocondrial entre los animales conplásticos, aunque el consumo de oxígeno es ligeramente menor en los animales BL/6^{NZB}.

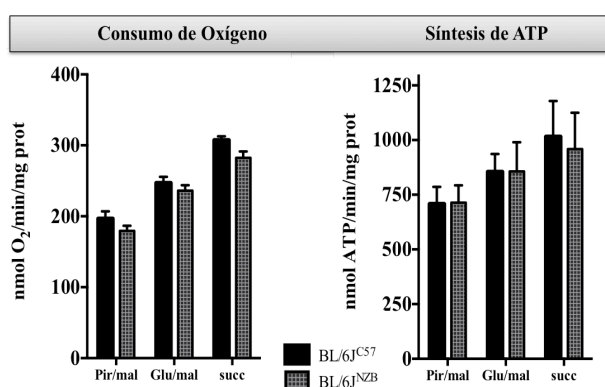


Figura II.1: Función respiratoria mitocondrial en hígados de ratones BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}. Consumo de oxígeno y síntesis de ATP por mitocondrias aisladas de hígado, determinados mediante los sustratos piruvato/malato (Pir/mal), glutamato/malato (Glu/mal) y succinato (succ), y normalizada frente a los mg de proteína mitocondrial. Machos de 8 semanas de edad, n=4. Las gráficas muestran la Media ±SEM.

En el estudio comparativo de las líneas celulares que contenían los mtDNA C57BL/6 y NZB se observó que existían diferencias en el rendimiento de OXPHOS, pero estaban enmascaradas por una inducción de la biogénesis mitocondrial debida a una mayor producción de ROS (Moreno-Loshuertos et al., 2006). Por ello, se midió en los ratones conplásticos el contenido de mtDNA relativo al nDNA en homogenados de hígado, y se determinaron los niveles de H₂O₂ mitocondrial mediante la conversión de Mito B a Mito P (*ver material y métodos*). Ambos parámetros son significativamente superiores en los animales BL/6^{NZB} (Figura II.2), es decir, hay una coincidencia entre mayor número de copias de mtDNA y mayor producción de ROS.

En las células en cultivo, tras incubar las células con N-acetil cisteína (NAC), un precursor de glutatión, el número de copias de mtDNA se ecualizaba y se revelaban las diferencias en la capacidad respiratoria (Moreno-Loshuertos et al., 2006). Para verificar si este comportamiento tiene alguna relevancia *in vivo*, se administró en paralelo NAC en agua de bebida a un grupo de animales BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} durante 8 semanas (desde las 4 semanas de edad hasta las 12). En primer lugar se analizó si la administración del NAC produce una disminución de la cantidad H₂O₂ mitocondrial en el hígado, y a continuación se midió el contenido de mtDNA y se analizó la respiración y la ratio de síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de este órgano.

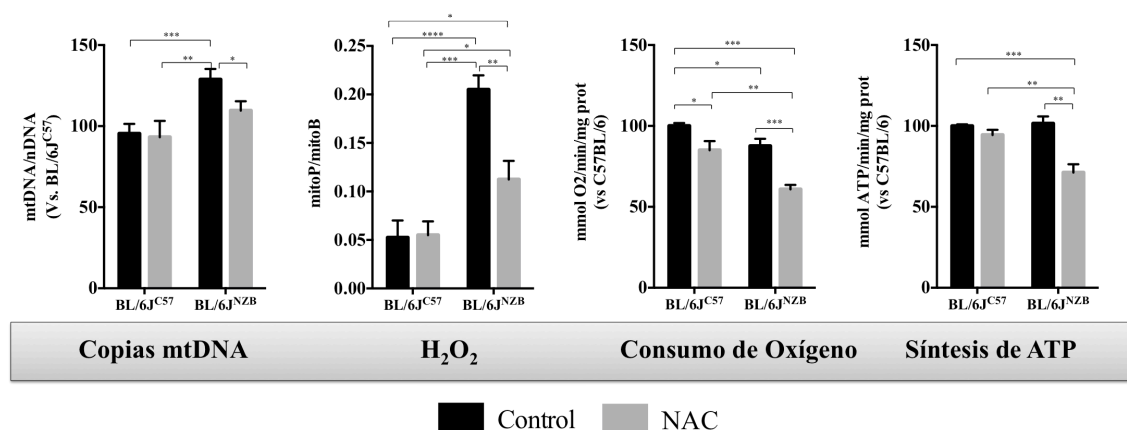


Figura II.2: Biogénesis mitocondrial, producción de ROS, capacidad respiratoria y efecto del N-acetil cisteína (NAC) en hígado de ratones BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}. Para el consumo de oxígeno y síntesis de ATP se utilizaron los sustratos piruvato/malato. Machos de 12 semanas de edad sin tratamiento (negro) y tras la administración de NAC, al 1% en agua de bebida durante 8 semanas (gris). Copias de mtDNA (n=6-12), H₂O₂ (n=6), Consumo de Oxígeno y Síntesis de ATP (n=6). Las gráficas muestran la Media \pm SEM; (t-test, *p< 0.05).

In vivo, la administración de NAC reduce significativamente los niveles de H₂O₂ mitocondrial en el hígado en los ratones BL/6^{NZB} que correlaciona con una disminución en el número de copias de mtDNA, y en paralelo con una reducción en la respiración y síntesis de ATP (Figura II.2). Sin embargo en los ratones BL/6^{C57}, la administración de NAC no parece

tener efectos significativos en cuanto a la función mitocondrial hepática se refiere, si bien es cierto que se observa una leve disminución en el consumo de oxígeno.

Con este experimento confirmamos *in vivo* los resultados publicados anteriormente por nuestro grupo, ponemos de manifiesto que las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB inducen diferencias en la función de la mETC, y revelamos que las variantes de mtDNA pueden inducir una susceptibilidad diferencial a compuestos de uso clínico común como el NAC.

In vivo, las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB inducen diferencias en la producción de ROS y en biogénesis mitocondrial, y un diferente rendimiento de OXPHOS.

IIA.2 Evaluación de la ganancia de peso y actividad

Con el primer experimento hemos revelado que las variantes sanas de mtDNA C57BL/6 y NZB promueven diferencias en la función mitocondrial *in vivo*. Pero el diferente rendimiento de OXPHOS está compensado con un aumento en la biogénesis mitocondrial mediado por una mayor producción de ROS. Por ello, quisimos evaluar si las diferencias funcionales descritas tienen alguna repercusión fenotípica en el individuo.

Para explorar esta cuestión se evaluó la ganancia de peso, se registró el consumo de comida y bebida, y se evaluó la actividad de machos y hembras de las cuatro estirpes de ratón: BL/6^{C57}, BL/6^{NZB}, NZB^{NZB} y NZB^{C57}.

Las líneas puras C57BL/6J (BL/6^{C57}) y NZB/OlaHsd (NZB^{NZB}), difieren considerablemente tanto en el tamaño como en el peso, siendo más grandes los animales NZB/OlaHsd. Sin embargo, la apariencia de los animales jóvenes con el mismo fondo nuclear y diferente mtDNA es prácticamente idéntica. Diez animales por género y línea fueron pesados a las 6 semanas de edad y se registró el peso semanalmente durante tres meses. En condiciones de alimentación *ad libitum* y con una dieta de mantenimiento, el cambio de mtDNA no parece afectar la ganancia de peso, ni en machos ni en hembras. (Figura II.3).

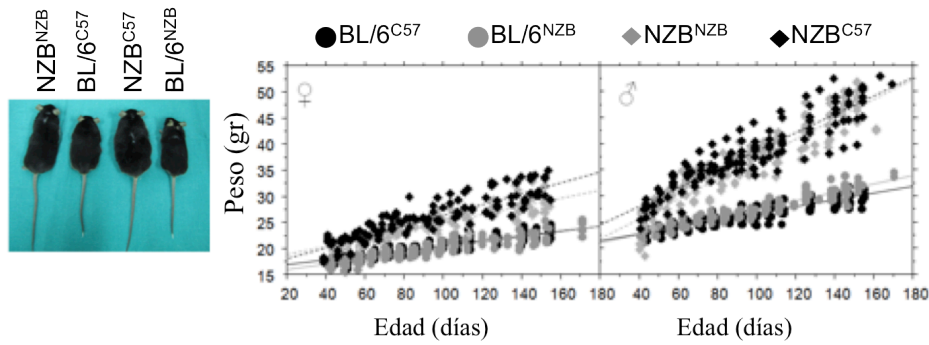


Figura II.3: Aspecto general y ganancia de peso en los ratones BL/6^{C57}, BL/6^{NZB}, NZB^{NZB} y NZB^{C57}. Apariencia externa de un macho representativo de cada grupo a los 4 meses de edad. Evolución del peso hasta los 5 meses de edad en machos y hembras (n=10).

Del mismo modo, cada semana se pesó la cantidad de comida suministrada y quitada, calculando la ingesta como la diferencia de ambos valores. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de comida ingerida entre animales conplásticos, pero cuando se comparó la conversión de gramos de comida ingerida respecto al peso ganado, se puso de manifiesto que los ratones con el mtDNA NZB presentaban mayor rendimiento en la conversión de comida en peso que sus líneas isogénicas para el nDNA (*Figura II.4 A*).

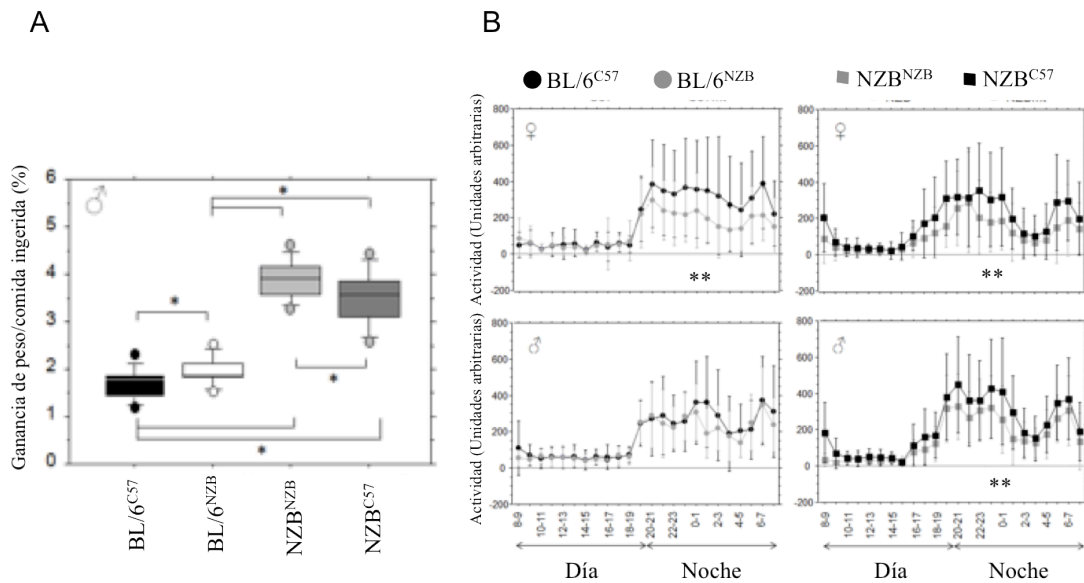


Figura II.4: Ganancia de peso por gramo de comida ingerida y actividad en ratones BL/6^{C57}, BL/6^{NZB}, NZB^{NZB} y NZB^{C57}. (A) Ganancia de peso respecto a la cantidad de comida ingerida en machos desde las 6 a las 16 semanas de edad (n=10) (*p<0.05, t-test). (B) Actividad media por horas registrada durante 4 días en machos de 10 semanas de edad (n=10); la significación es respecto al área bajo la curva, (*p<0.05, t-test).

En el registro de la actividad de los ratones a las 10 semanas de edad con el sistema “Physiocage” (Panlab), se advirtió que el ciclo circadiano estaba fuertemente influenciado por el fondo nuclear, siendo el periodo de actividad más largo en los animales con el fondo genético nuclear NZB. Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de la actividad nocturna en función del mtDNA, independientemente del fondo nuclear y del género. Así, los ratones con el mtDNA C57 son más activos que los ratones con el mtDNA NZB (*Figura II.4 B*).

En animales jóvenes, la apariencia externa y la ganancia de peso es similar entre los ratones conplásticos, pero hay indicios que apuntan a posibles diferencias metabólicas determinadas por el complemento mitocondrial.

IIA.3 Evaluación del perfil transcriptómico

Las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB promueven diferencias a nivel de la función OXPHOS, sin embargo las repercusiones fenotípicas en el individuo son casi inapreciables. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si las diferencias en la función mitocondrial eran detectadas a nivel celular mediante el estudio de la firma transcriptómica global utilizando la tecnología de RNAseq. Para ello se analizó hígado y corazón de 12 machos por estirpe (BL/6^{C57}; BL/6^{NZB}; NZB^{NZB} y NZB^{C57}) de 10 semanas de edad (*ver material y métodos*).

La agrupación jerárquica de la matriz de distancias de la expresión de todos los genes detectados con el RNAseq (*Figura II.5*) reveló que aunque la firma de la expresión génica, como es de esperar, está principalmente determinada por el tejido y el origen nuclear de las líneas de ratones, existen cambios en el perfil transcriptómico global entre las líneas con el mismo fondo nuclear y diferente mtDNA. Es decir, las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB con el mismo fondo genético nuclear promueven una firma transcriptómica específica.

El fondo genético nuclear (C57BL/6 vs. NZB) y el tejido (corazón vs. hígado) determinan el impacto del mtDNA en el número de genes diferencialmente expresados (*Figura II.6*). En ambos tejidos, el intercambio de las variantes de mtDNA tiene un mayor impacto en el fondo nuclear NZB. Por otro lado, el mtDNA tiene mayor impacto cuantitativamente en hígado que en corazón en el caso del fondo nuclear C57BL/6, pero sin embargo, en el fondo nuclear NZB las diferencias son mayores en corazón.

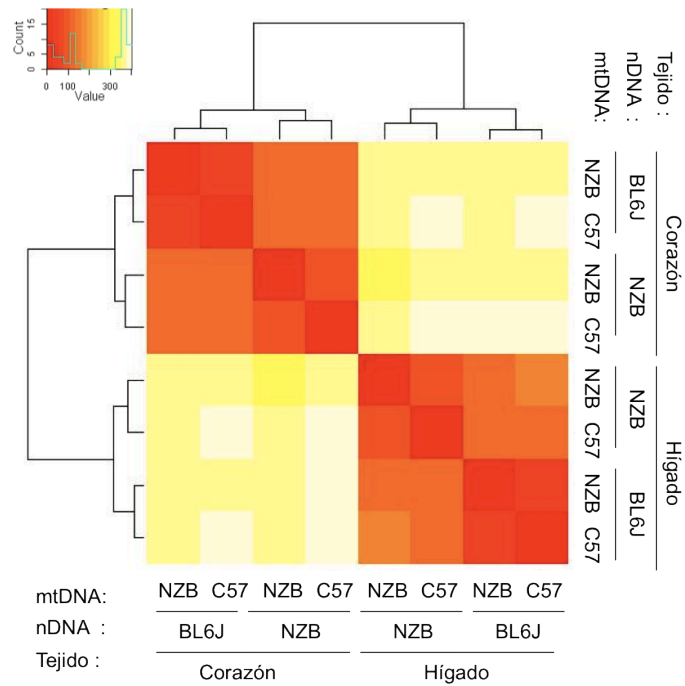


Figura II.5: Análisis de RNAseq: Matriz de distancias del \log_2 de la expresión normalizada de los niveles promediados sobre todos los replicados por condición para todos los genes detectados usando RNA-Seq. La agrupación jerárquica de la matriz muestra diferencias transcriptómicas específicas por tejido, por DNA nuclear y por DNA mitocondrial.

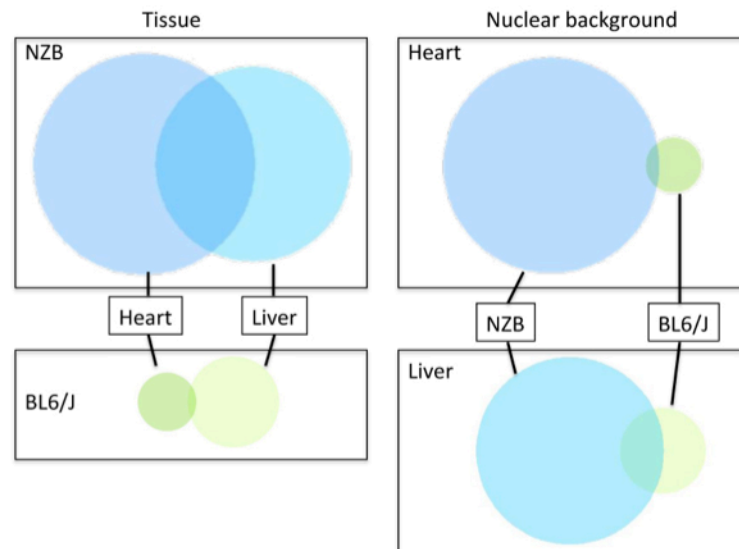


Figura II.6 Análisis de RNAseq: Diagramas de Venn de los genes diferencialmente expresados entre los animales conplásticos y sus líneas isogénicas para el nDNA para cada tejido. El tamaño de los círculos es proporcional al número de genes diferencialmente expresados para cada comparación.

A continuación, se analizaron las funciones moleculares y celulares específicamente afectadas en cada comparación con el Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Figura II.7). En total 28 funciones moleculares presentaron un enriquecimiento significativo al menos en alguna de las comparaciones. De las cuales 17 de ellas eran comunes en los cuatro casos, destacando el “metabolismo de carbohidratos y lípidos”, la “bioquímica de pequeñas moléculas”, la “muerte y supervivencia celular” y la “replicación, recombinación y reparación del DNA”.

Otras funciones están específicamente alteradas en uno de los tejidos. Por ejemplo, en el hígado las funciones “síntesis de proteínas”, “metabolismo de aminoácidos”, “Ciclo celular” y “*scavenger* de radicales libres”, están significativamente enriquecidas en los animales conplásticos en ambos contextos nucleares.

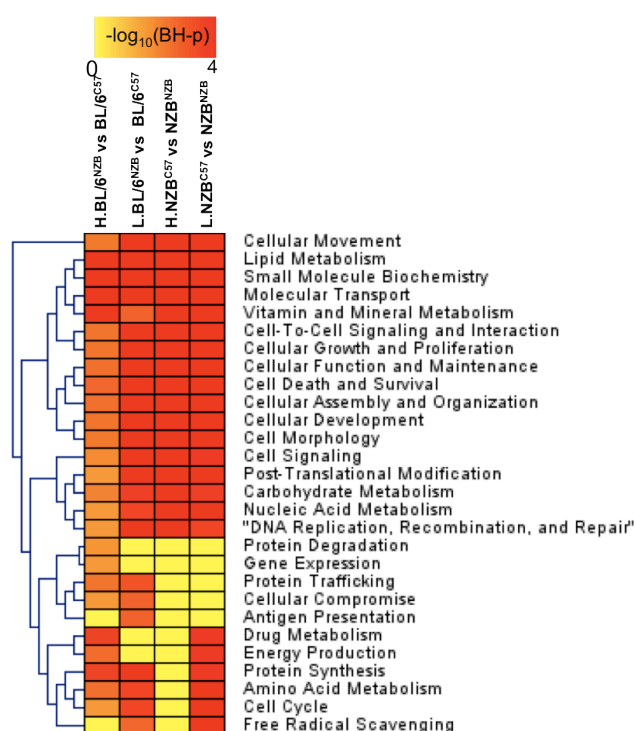


Figura II.7. Análisis de RNAseq: Heatmap y agrupación jerárquica del enriquecimiento ($\log_{10}(\text{BH-p})$) en las funciones moleculares y celulares definidos por IPA para los cuatro grupos de genes diferencialmente expresados entre conplásticos y su línea isogénica para el nDNA. El color amarillo corresponde a un enriquecimiento no significativo (B-H ajustado $p\text{-value}=1$) y el rojo muy significativo (B-H ajustado $p\text{-value}<10^{-4}$)

En conclusión, los datos del análisis del RNAseq revelan que las diferencias promovidas por las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB en la función OXPHOS son detectadas por el genoma nuclear regulando la expresión de genes implicados principalmente en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Pero además, el perfil transcriptómico se ve afectado por la combinación de mtDNA/nDNA y por el contexto celular.

Diferentes combinaciones del nDNA/mtDNA inducen una modulación transcriptómica celular en el hígado y corazón.

IIA.4 Evaluación del perfil metabolómico

Los datos presentados sugieren que el mtDNA influye en el estatus metabólico del hígado y corazón. Los cambios en la expresión génica pueden reflejar sólo una parte de la respuesta adaptativa a una combinación particular de nDNA/mtDNA, ya que pueden haber también modificaciones post transcripcionales o regulaciones alostéricas que no comprometan a la expresión génica. También podría ocurrir, que la respuesta transcriptómica sea suficiente para adaptar la función del tejido a los diferentes genotipos de mtDNA, permitiendo a el organismo con el nDNA idéntico pero diferente mtDNA alcanzar un rendimiento metabólico indistinguible.

Para explorar esta alternativa es más detalle, se determinó el perfil metabolómico en muestras de hígado y plasma de los ratones BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}. Se analizaron 6 animales macho de 12 semanas de edad por grupo, y se detectaron un total de 313 y 287 metabolitos en hígado y plasma respectivamente (*ver material y métodos*).

En primer lugar, se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) del perfil bioquímico de los 197 metabolitos detectados comunes a hígado y plasma. Ambas matrices mostraron un agrupamiento significativo entre hígado y plasma, y también entre los animales BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}. Además, los análisis de PLS-DA incluyendo todos los metabolitos detectados para cada matriz, confirman el agrupamiento en función del mtDNA tanto en hígado (313 metabolitos) como en plasma (287 metabolitos), revelando que el mtDNA tiene un impacto en los niveles de los metabolitos celulares (*Figura II.8*).

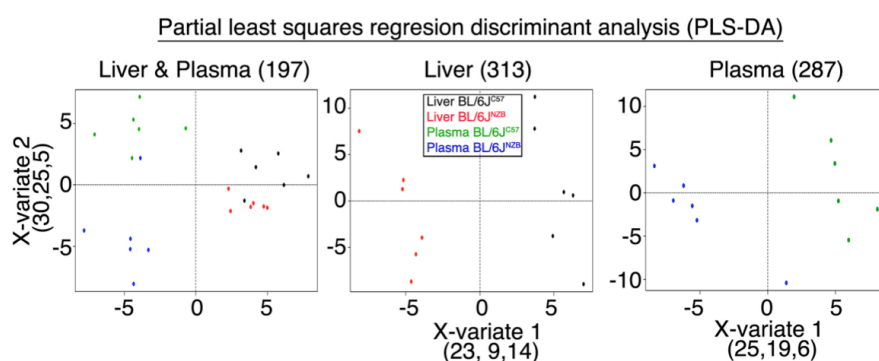


Figura II.8 PLS-DA Metabolómica. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) del panel de metabolitos de los animales conplásticos. Izquierda: metabolitos comunes en hígado y plasma. Centro: todos los metabolitos detectados en hígado. Derecha: todos los metabolitos detectados en plasma.

Un total de 23 metabolitos en hígado y 25 en plasma son los responsables del agrupamiento en el PLS-DA de los animales conplásticos, y se observó que estos metabolitos indicaban la alteración de, principalmente, tres procesos: el metabolismo del glutatión, el metabolismo de lípidos y membranas y el metabolismo relacionado con la digestión y absorción de nutrientes (Figura II.9). Para confirmar esta observación, se realizó análisis de enriquecimiento de metabolitos (MSEA) (ver material y métodos).

Pathway	Sub-Pathway	Liver	Plasma	Biochemical Name	Metabolic Route	PLS*
Amino Acid	Alanine & aspartate metabolism			alanine		P
	Butanoate metabolism			2-aminobutyrate	ROS	L
	Creatine metabolism			creatine	Energy Metabolism	L P
	Glutamate metabolism			glutamine		P
	Glutathione metabolism			ophthalmate	ROS	L
	Phenylalanine & tyrosine metabolism			phenol sulfate	?	L P
	Urea Cycle; arginine & proline metabolism			urea	Amino acid degradation	P
				arginine		P
				citrulline		P
Carbohydrate	Nucleotide sugars, pentose metabolism			arabinose	ROS	P
				xylose		P
Cofactors & Vitamins	Folate metabolism			dihydrobiopterin		P
	Riboflavin metabolism			flavin adenine dinucleotide (FAD)		L
Lipid	Bile acid metabolism			glycocholate	Intestinal absorption	L
				tauroursodeoxycholate		L
	Essential fatty acid			linolenate (alpha or gamma; (18:3n3 or 6))	Lipid metabolism and Membrane Turnover	L
	Fatty acid, branched			15-methylpalmitate (isobar with 2-methylpalmitate)		L
				17-methylstearate		L
	Fatty acid, dihydroxy			12,13-hydroxyoctadec-9(Z)-enoate	ROS	L
	Long chain fatty acid			margarate (17:0)		L
				mead acid (20:3n9)		P
				myristoleate (14:1n5)		L
				nonadecanoate (19:0)		L
				oleate (18:1n9)		P
	Lysolipid			1-arachidonoylglycerophosphocholine*	Lipid metabolism and Membrane Turnover	L
				1-docosa-hexaenoylglycerophosphocholine*		L
				1-stearoylglycerophosphoethanolamine		P
Nucleotide	Pyrimidine metabolism			2'deoxyctidine	Nucleotide metabolism	P
				thymidine		P
	Pyrimidine metabolism, thymine containing; Valine, leucine and isoleucine metabolism/			3-aminoisobutyrate	Lipid signaling	L
Peptide	Dipeptide			pro-hydroxy-pro	Intestinal absorption	P
	Fibrinogen cleavage peptide			TDTEKGFLSEGGV*	ROS	P
	gamma-glutamyl			g-glutamylalanine	ROS	P
				g-glutamylleucine		L
				g-glutamylmethionine		P
				g-glutamylphenylalanine		P
Xenobiotics	Food component/Plant			daidzein	Intestinal absorption	P
				ergothioneine		L
				formononetin		L
				2-oxindole-3-acetate		P

(en la página anterior) **Figura II.9. Metabolitos y rutas metabólicas relevantes en el PLS-DA.** Listado de los metabolitos que contribuyen más al PLS-DA en hígado (L) y plasma (P) agrupados por funciones celulares. La lista de metabolitos ha sido revalidada y sólo los metabolitos presentes en más del 50% de las interacciones han sido considerados. El color bajo el nombre bioquímico indica metabolitos que actúan como potenciales marcadores de las rutas metabólicas indicadas. En el análisis de PLS-DA están enriquecidos compuestos implicados en el metabolismo del glutatión, de fosfolípidos y en procesos de digestión/absorción.

Metabolismo del Glutatión (Figura II.10)

La mayoría de los compuestos involucrados en el metabolismo del glutatión pudieron ser cuantificados, revelando un enriquecimiento tanto en el hígado como en el plasma de los animales BL/6^{NZB}. Los niveles relativos del glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) son muy similares entre ambas líneas de ratón. Sin embargo, el oftalmato, un compuesto generado por la misma enzima que sintetiza el glutatión y que sirve como lectura de la biosíntesis de GSH (Soga et al., 2006), está significativamente incrementado en el hígado y plasma de los animales BL/6^{NZB}. Por otra parte, los niveles de los γ -glutamyl-aminoácidos, tanto en suero como en hígado, están incrementados en el grupo de los animales BL/6^{NZB}, lo cual indicaría una mayor actividad de la γ -glutamyl-transferasa (GGT), enzima responsable de la degradación del glutatión. Por lo tanto, en los animales BL/6^{NZB}, hay un incremento simultáneo tanto de los metabolitos de la síntesis como de la degradación del glutatión, lo que sugiere una mayor actividad y recambio del mismo, indicando una mayor actividad de los mecanismos de defensa de ROS. Esta suposición, se ve reforzada por la detección de menores niveles de 12,13-hidroxioctadec-9(Z)-enoato, un producto de peroxidación lipídica, en los animales BL/6^{NZB}.

Metabolismo de lípidos y membranas (Figura II.11)

Como se ha señalado, en el análisis de PLS-DA destacan componentes relacionados con el metabolismo de lípidos y membranas, incluyendo moléculas relacionadas con la señalización y regulación de lípidos (campesterol y 3-aminoisobutirato) (Roberts et al., 2014) y un gran número de ácidos grasos y lisolípidos. El análisis de MSEA refuerza la observación de que el contenido de fosfolípidos en el hígado está significativamente afectado por el mtDNA, sugiriendo un aumento en el metabolismo de lípidos en los animales BL/6^{NZB}.

Metabolismo de ácidos biliares y componentes de la ingesta (Figura II.11)

Una diferencia muy interesante entre las dos estirpes de ratones, es la alteración de los niveles de ácidos biliares y componentes xenobióticos en plasma e hígado. Los ácidos biliares son críticos en la absorción intestinal de nutrientes, en particular de lípidos y xenobióticos, y también juegan un papel crítico en el metabolismo y en la homeostasis hepática. Los análisis de MSEA revelan un enriquecimiento significativo de los metabolitos biliares en el hígado de los

animales BL/6^{NZB}, y de componentes de la ingesta tanto en el hígado como en plasma. Lo cual sugiere diferencias globales metabólicas en la absorción intestinal entre los animales BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}.

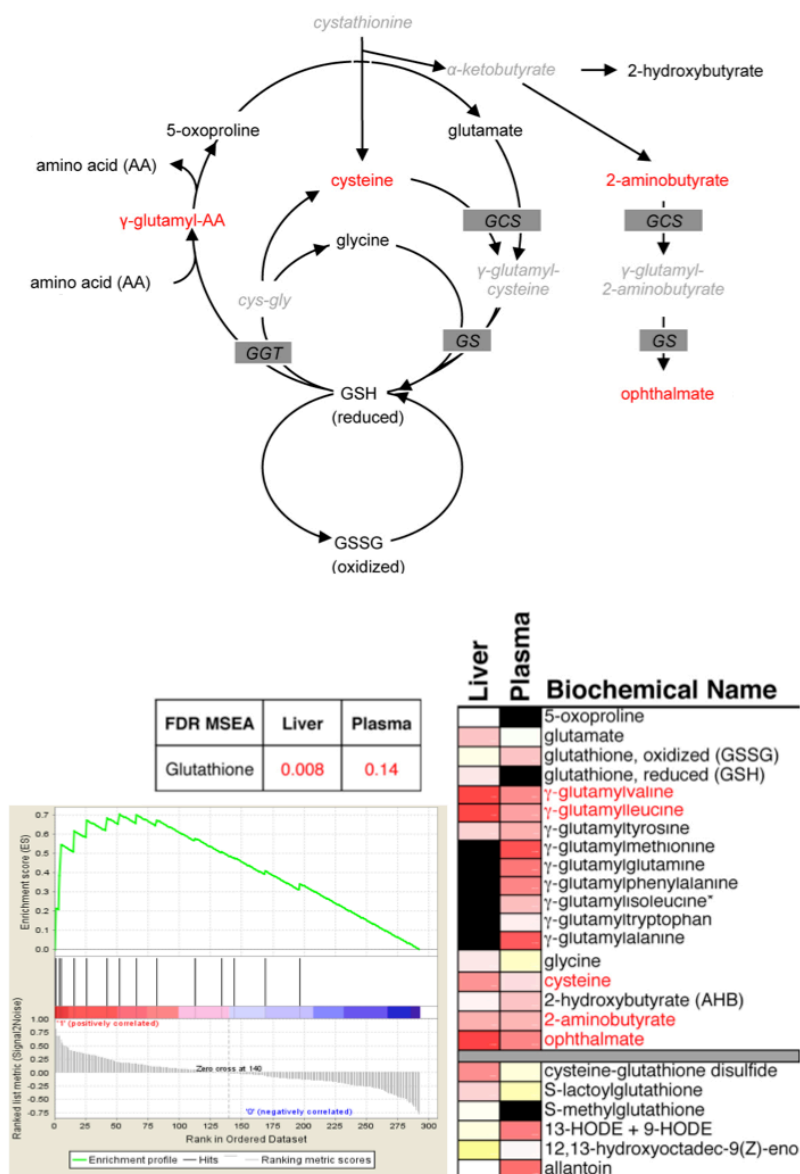


Figura II.10: Metabolismo del Glutación. En la parte superior se muestra un esquema del metabolismo del glutación. En la parte inferior derecha, heat-map mostrando todos los metabolitos implicados en el metabolismo de GSH teniendo en cuenta si son relevantes o no en el PLS-DA. El código de color representa el log fold change de (BL6^{NZB}/BL6^{C57}); negro: no detectado; blanco: no hay cambios (log fc=1); rojo: tendencia de enriquecimiento en las muestras BL/6^{NZB} (log fc>1); amarillo: tendencia a la disminución en las muestras BL/6^{NZB} (log fc<1) y negro: no detectado. En la parte inferior izquierda se muestra el MSEA y la estimación significativa del FDR.

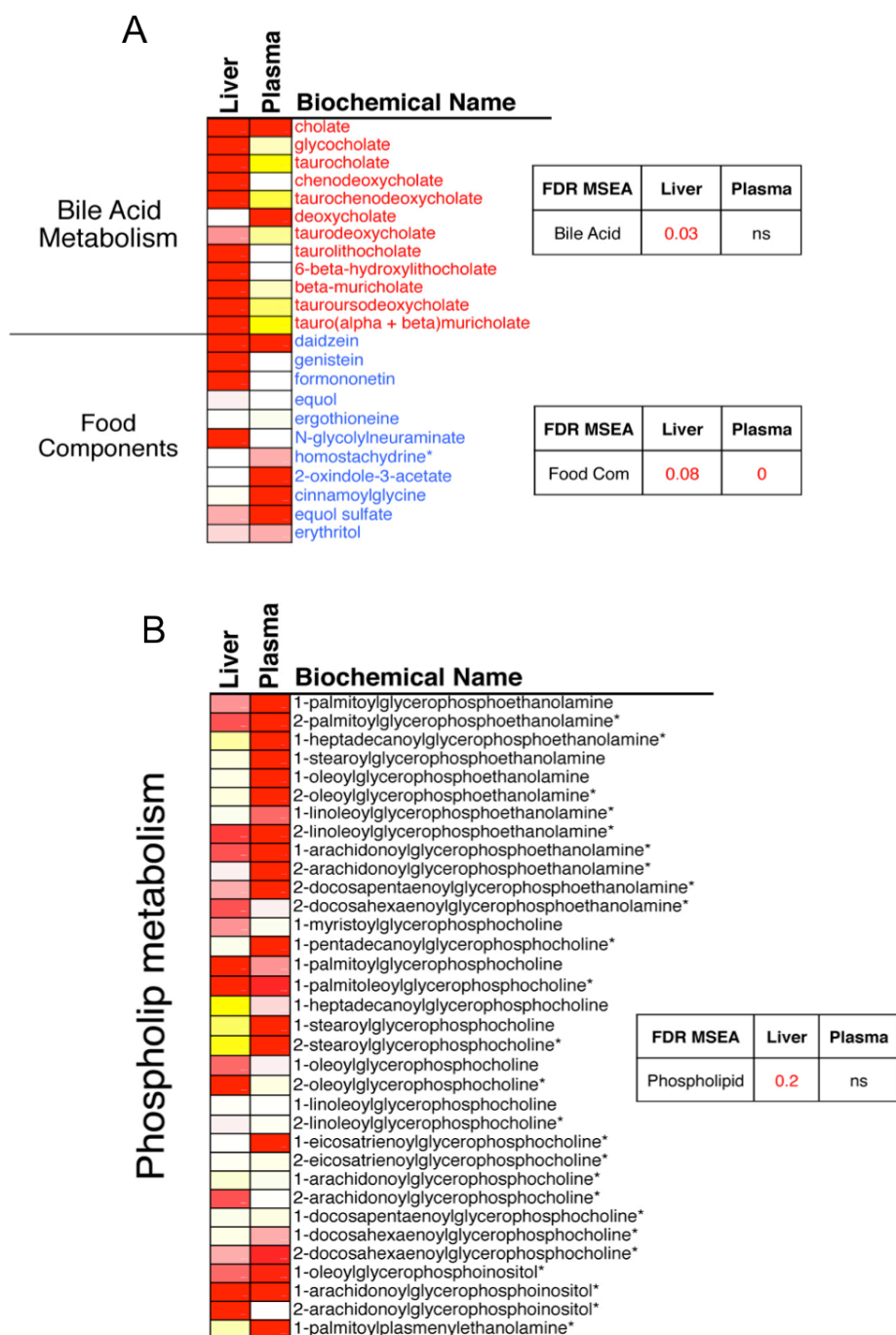


Figura II.12. Metabolismo de fosfolípidos, ácidos biliares y componentes de la ingesta. Heat-maps mostrando todos los metabolitos implicados en el metabolismo de ácidos biliares y xenobióticos (parte superior) y metabolismo de fosfolípidos (inferior) teniendo en cuenta si son relevantes o no en el PLS-DA. El código de color representa el log fold change de (BL6^{NZB}/BL6^{C57}); negro: no detectado; blanco: no hay cambios (log fc=1); rojo: tendencia de enriquecimiento en las muestras BL/6^{NZB} (log fc>1); amarillo: tendencia a la disminución en las muestras BL/6^{NZB} (log fc<1). En la parte derecha la estimación significativa del FDR tras el MSEA en hígado y plasma.

En resumen, el perfil metabolómico indica claros efectos del genoma mitocondrial en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, de xenobióticos y anti-oxidante. Estos efectos podrían tener un impacto significativo en un gran número de procesos fisiológicos, como son la

inflamación, el estrés oxidativo y el metabolismo energético. Por lo tanto, la firma metabolómica indica que la respuesta transcriptómica es insuficiente para prevenir las consecuencias metabólicas de diferentes combinaciones de nDNA/mtDNA, y por tanto el haplotipo de mtDNA puede afectar la actividad metabólica basal.

IIA.5 Evaluación de las implicaciones del mtDNA en el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos

Los datos de metabolómica reflejan diferencias en el metabolismo del glutatión entre los animales BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} que correlacionan con la mayor producción de H₂O₂ mitocondrial en los animales BL/6^{NZB} (*apartado II.1*). Pero a pesar de que tanto los análisis de transcriptómica como de metabolómica sugieren que el metabolismo de carbohidratos y lípidos es diferente entre los animales BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}, no se han observado diferencias en la ganancia de peso en las condiciones de mantenimiento de los ratones (i.e. alimentación *ad libitum*), aunque si que hay datos que apuntan a modestas diferencias en la eficiencia de conversión del alimento en peso (*apartado II.2*).

Por ello, se forzó la utilización de lípidos sustituyendo la dieta común de mantenimiento (donde el 61% de las kcal están aportadas por carbohidratos, el 17% por grasa y el 22% por proteína) por una dieta rica en grasa (20% carbohidratos, 60% grasa y 20% proteína). Un grupo de 8 animales por estirpe (BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}) fueron alimentados con dieta grasa desde el destete, y se siguió la evolución del peso semanalmente durante tres meses. Observamos que con una dieta alta en grasa, los ratones BL/6^{C57} tienen una ganancia de peso mucho más acusada que los BL/6^{NZB}, aunque después de tres meses con esta dieta ambas líneas de ratón llegan a alcanzar el mismo peso.

Se sacrificó un grupo de tres animales de 8 semanas de edad, por dieta y estirpe, tras dos semanas con una dieta grasa o convencional, y se realizaron cortes histológicos del tejido adiposo blanco para cuantificar el tamaño de los adipocitos, que es significativamente mayor en los ratones BL/6^{NZB} alimentados con la dieta de mantenimiento. Sin embargo, tras dos semanas con dieta grasa, el tamaño de los adipocitos era significativamente superior en los animales BL/6^{C57}.

Estos resultados sugieren que, tal como apuntan los datos de metabolómica y transcriptómica, el mtDNA induce diferencias en el metabolismo de lípidos y carbohidratos que se acentúan al forzar la utilización de ácidos grasos mediante una dieta alta en grasa.

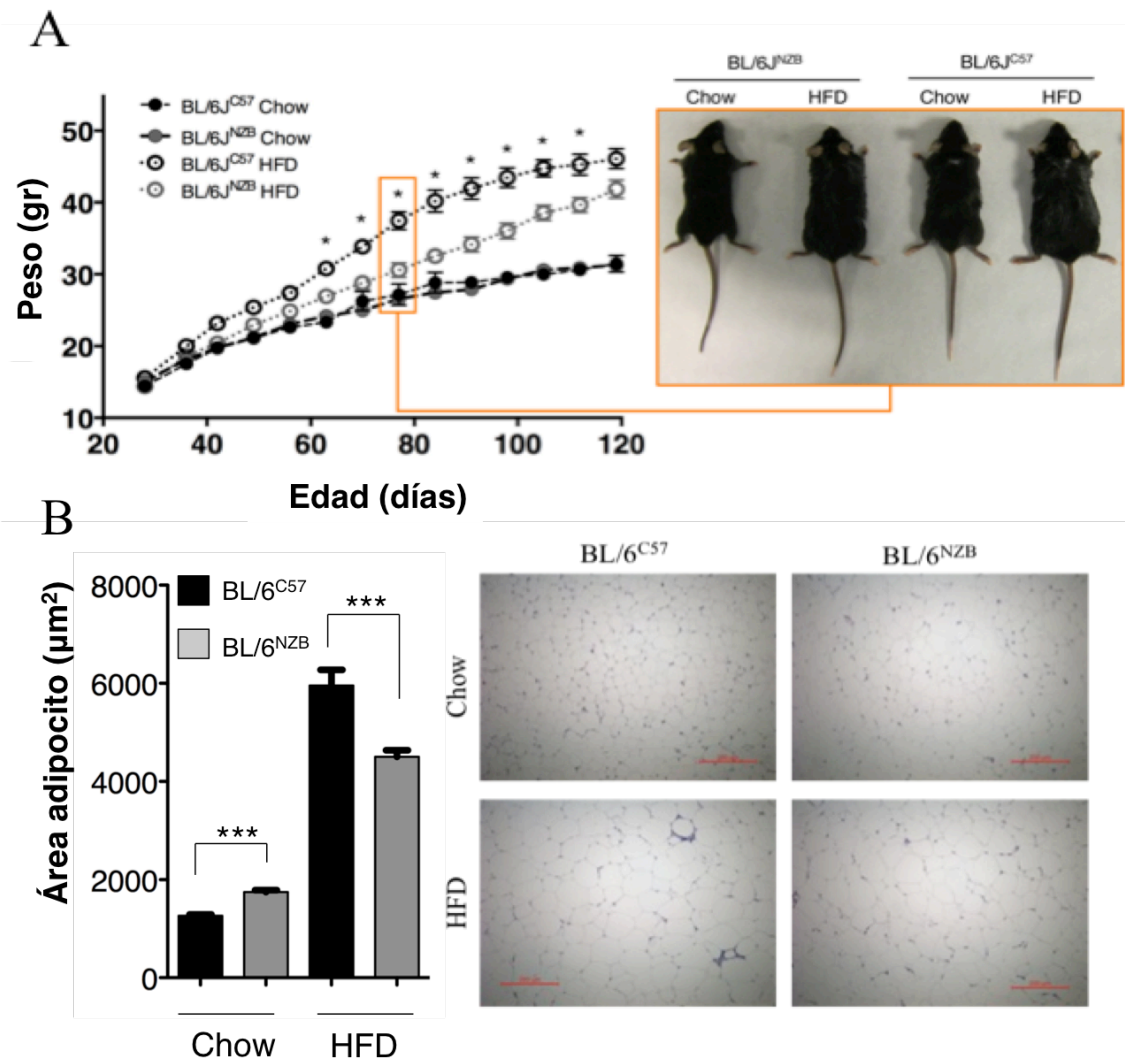


Figura II.13. Alimentación con HFD. (A) Evolución del peso en ratones macho BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}, (n=8) durante tres meses, alimentados ad libitum con la dieta control 5K67 LabDiet® (Chow) y la dieta alta en grasa D12492 Open Source Diets® (HFD). Media±S.E.M. (B) Cuantificación del área de los adipocitos del tejido adiposo blanco epididimal, en machos de 8 semanas tras 2 semanas con dieta grasa y normal. (n=3). Imagen de microscopía representativa de la grasa epididimal de los animales teñida con hematoxilina-eosina. (Media±S.E.M *p<0,05, t-test)

IIA.6 Discusión (1)

La función OXPHOS está determinada por la asociación e interacción entre las proteínas codificadas por el mtDNA y el nDNA. Por lo tanto diferentes combinaciones, desencadenaran consecuencias funcionales características, fenómeno que denominamos *mismatch intrínseco*. Además, como hemos discutido en la introducción, la mETC es un sistema dinámico y versátil tanto desde un punto de vista funcional como estructural, así que el resultado de la interacción de ambos genomas también dependerá de la función que tiene que desempeñar la mitocondria,

específica de tejido e influida por factores ambientales. En este primer capítulo, hemos puesto de manifiesto experimentalmente la hipótesis de que el doble origen de los complejos respiratorios da lugar a un amplio rango de alternativas con diferentes rendimientos, y que una diferencia genética primaria (introducción del haplotipo de mtDNA NZB en un fondo nuclear C57BL/6 o del mtDNA C57BL/6 en un fondo nuclear NZB), genera una respuesta transcriptómica y metabólica específica.

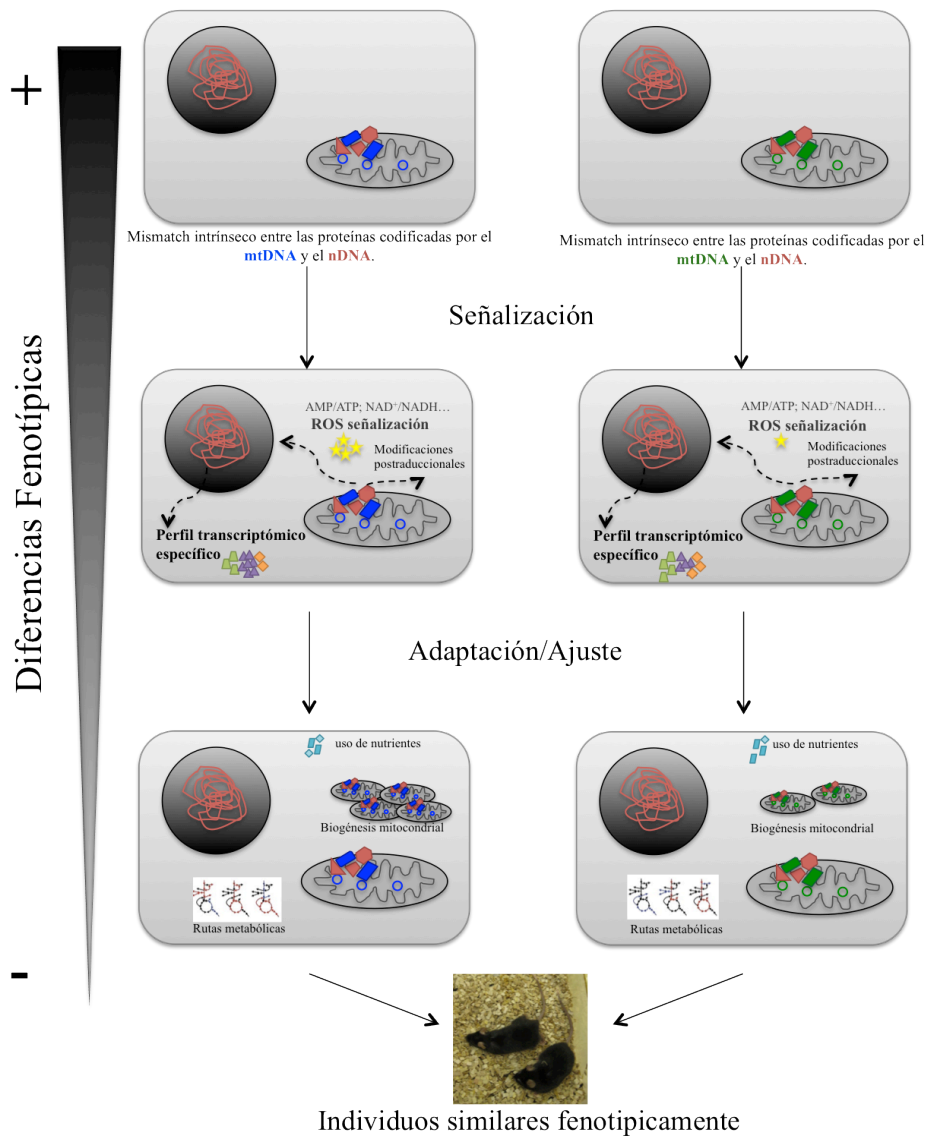
En 2006, con la publicación del trabajo de la Dra. D^a. Raquel Moreno-Loshuertos, se sembró una nueva idea: detrás de una aparente igualdad en la capacidad respiratoria de células con diferentes variantes de mtDNA, subyace una adaptación celular diferencial.

Por ello, proponemos que una combinación de nDNA/mtDNA desencadenará una señalización específica que desencadenará un ajuste metabólico celular para dicha combinación. La típicas señales de la actividad de la función mitocondrial descritas en la literatura son: las proporciones de los pares NAD^+/NADH , AMP/ATP , ADP/ATP , los niveles de acetil-CoA o los niveles de ROS. En este trabajo, hemos demostrado *in vivo* que los ROS pueden actuar como señalizadores de la función mitocondrial desencadenando una adaptación celular como es el aumento de la biogénesis mitocondrial, que ecualiza la función respiratoria en el hígado entre ratones conplásticos.

Se ha descrito que estas moléculas de señalización mitocondrial son capaces de regular la función OXPHOS mediante el control de procesos de transcripción de genes nucleares, modificaciones postraduccionales o efectos alostéricos en determinadas enzimas. Con los resultados del RNAseq, hemos demostrado que ante diferentes combinaciones de nDNA/mtDNA, se produce una firma transcriptómica específica, que conlleva una expresión diferencial de genes involucrados principalmente en el metabolismo lipídico y de carbohidratos, demostrando así que las variantes de mtDNA murinas NZB y C57BL/6J en el mismo fondo nuclear, generan un estatus metabólico celular diferente.

Esta señalización específica desencadena una serie de procesos de adaptación y de ajuste para la optimización de la función OXPHOS, como es el aumento de la biogénesis mitocondrial. Pero además, los datos de metabolómica sugieren una regulación de la actividad basal de numerosas enzimas (i.e 12-LOX, PLA2, GATM o GGT) relevantes en diferentes procesos como el metabolismo de lípidos o la respuesta al estrés oxidativo. La función OXPHOS también puede ser optimizada mediante la regulación de las fuentes de carbono utilizadas para obtener los equivalente de reducción. Además, las diferencias en los niveles de ácidos biliares y compuestos procedentes de la dieta, apuntan hacia una absorción diferencial de nutrientes entre los animales conplásticos.

En conclusión, en condiciones no patológicas, la función OXPHOS, determinada por el ajuste estructural y funcional de las proteínas codificadas por ambos genomas, desencadenará una cascada de señalización que permite una adaptación y ajuste celular enmascarando posibles diferencias fenotípicas causadas por variantes de mtDNA. Dicha adaptación implica modificaciones en procesos en los que el sistema OXPHOS juega un papel clave, como es el uso de nutrientes, el metabolismo energético y la producción/defensa de ROS.



Modelo I: Consecuencias fenotípicas promovidas por variantes de mtDNA. (Ver texto).

II.B Implicaciones fenotípicas de las variantes de mtDNA *in vivo* en animales adultos

El simple cambio del mtDNA (C57BL/6) por otra variante natural distinta (NZB) es suficiente para inducir cambios medibles en la función mitocondrial. Son diferencias modestas, que no inducen patología, pero que son capaces de desencadenar una respuesta transcriptómica y metabólica celular específica y detectable, es decir, afecta la actividad metabólica basal.

Así que, centrándonos en los animales BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}, nos propusimos evaluar si las diferencias en la funcionalidad de OXPHOS junto con sus implicaciones en el metabolismo celular tienen alguna relevancia en el mantenimiento de la homeostasis del organismo a lo largo de la vida del animal.

II.B.1 Valoración de la evolución del peso y signos fenotípicos

Se registró mensualmente el peso de 12 machos BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} respectivamente, desde el destete hasta los 16 meses de vida. De nuevo, no se encontraron diferencias en la ganancia de peso entre los animales conplásticos durante los 4 primeros meses de vida. Sin embargo, observamos que cuando se detiene el crecimiento de los animales (alrededor de los 5-6 meses), el peso se estabiliza en valores significativamente diferentes en las distintas estirpes de ratón. En la edad adulta, los animales BL/6^{C57} pesan una media de 4-6 gramos más que los animales BL/6^{NZB} (Figura II.14).

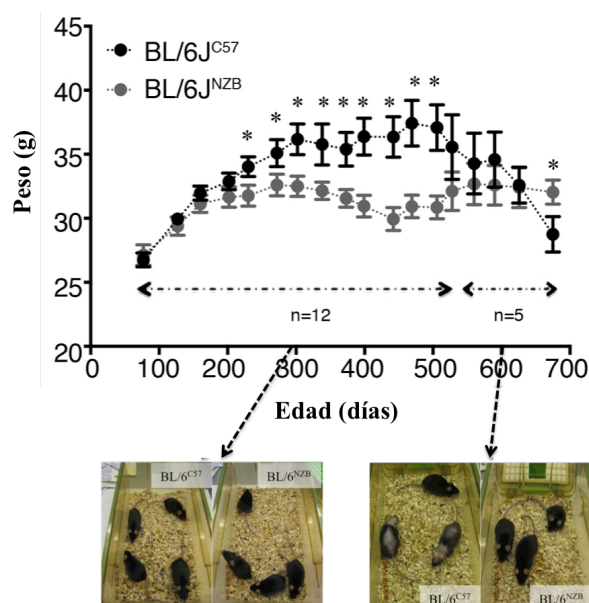


Figura II.14: Evolución del peso en un grupo de 12 machos BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} desde el destete hasta los 15 meses de edad. Y de un grupo de 5 animales por genotipo hasta los 24 meses de edad. Media±S.E.M, (*p<0,05, t-test)

Se añade una foto representativa de un grupo de animales de cada estirpe a los 300 y 600 días de edad.

A partir de los 20 meses de edad aproximadamente, los animales de estas líneas de ratón en las condiciones de estabulación descritas (*ver material y métodos*) empiezan a manifestar signos evidentes generales de envejecimiento y deterioro, como son alopecia, cifosis, glaucomas, prolapso rectal y pérdida de peso entre otros.

Desde los 16 meses de edad, se hizo un seguimiento de la aparición de signos de envejecimiento en un grupo de 5 ratones macho BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}. Cuando los animales estuvieron cerca de su vida máxima (24 meses de edad), se sacrificaron y se evaluaron marcadores fenotípicos de envejecimiento obteniendo un índice fenotípico tal y como había sido propuesto por el grupo del Dr. Larsson (Ross et al., 2013). Para ello tuvimos en cuenta la alopecia, la cifosis, el pelo canoso y la reducción de peso (*Figura II.15*). Además se añadió un nuevo parámetro que denominamos “lesiones diagnosticadas a la necropsia” ya que cuatro de los cinco animales BL/6^{C57} presentaban múltiples lesiones internas que sugerían la presencia de neoplasias hematopoyéticas como el sarcoma histiocitario y se ha descrito que son comunes en animales C57BL/6J asociadas con el envejecimiento (Pettan-Brewer and Treuting, 2011). Podemos concluir que el índice fenotípico de envejecimiento es significativamente mayor en los animales BL/6^{C57} a la edad de 24 meses (*Figura II.15*).

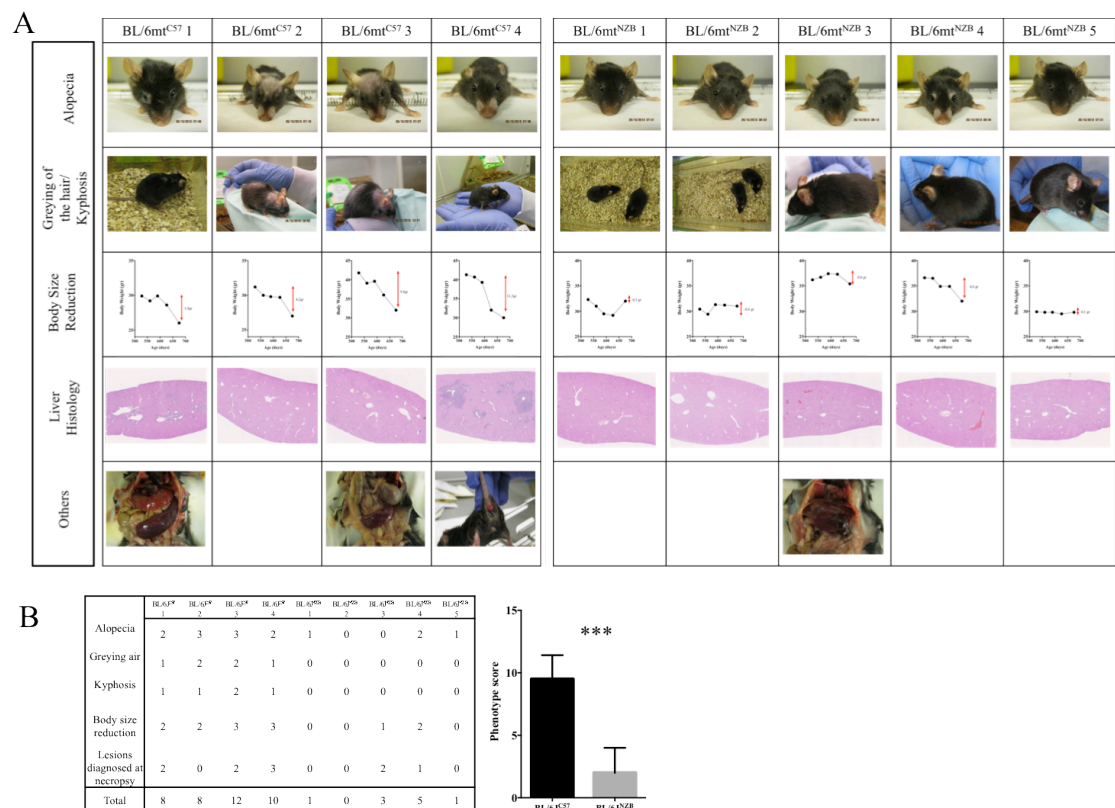


Figura II.15: (A) Apariencia general, evolución del peso y lesiones encontradas durante la necropsia en los animales BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} a los 2 años de edad. (B) Cálculo del marcador fenotípico de envejecimiento. Media±S.D. (*p<0,05, t-test).

El peso en la edad adulta se estabiliza en valores significativamente diferentes en los ratones BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}. Además, las características fenotípicas de los animales a los dos años de edad sugieren la existencia de un impacto del mtDNA en el envejecimiento.

IIB.2 Evaluación de aspectos metabólicos

Llama la atención la cantidad de estudios que asocian las variantes de mtDNA en humanos con numerosas enfermedades metabólicas caracterizadas por la desregularización de nutrientes, como son la obesidad (Nardelli et al., 2013; Yang et al., 2011) o la diabetes tipo II (Poulton et al., 2002).

Las diferencias en la evolución del peso entre los ratones conplásticos nos permiten asociar las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB con la predisposición, con la edad y tras la administración de una dieta con alto contenido de grasa, a desarrollar obesidad, reforzando la conclusión de que el metabolismo de lípidos está fuertemente influenciado por el haplotipo de mtDNA. Como indicador metabólico de obesidad, a las edades de 2 y 12 meses, se midieron los niveles de colesterol total, HDL y LDL en el plasma de ratones BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} alimentados con una dieta de mantenimiento. A los dos meses de edad, los niveles de los tres parámetros estaban ligeramente aumentados en los ratones BL/6^{NZB}; sin embargo, a los 12 meses, en correlación con el aumento de peso, los animales BL/6^{C57} tenían significativamente incrementados los niveles de colesterol total, HDL y LDL.

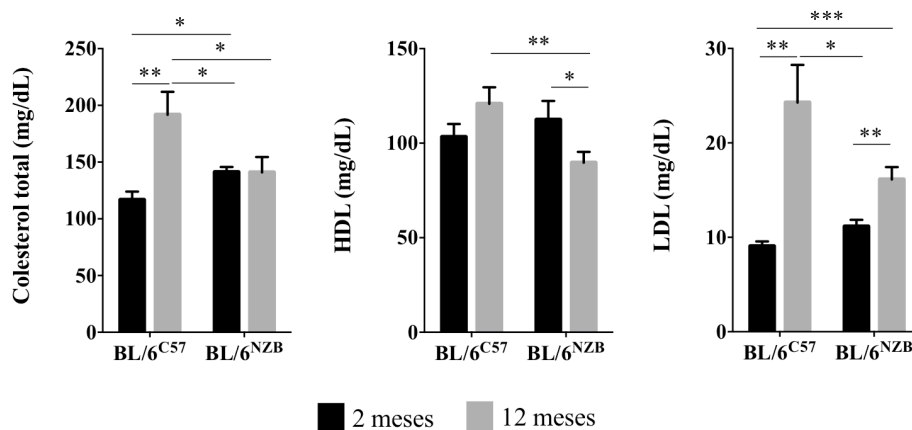


Figura II.16: Colesterol total, HDL y LDL en plasma. Machos BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} de 2 meses (n=8) y de 12 meses (n=12) Media±S.E.M, (*p<0,05, t-test).

Un signo característico asociado con el envejecimiento es la desregulación de la detección de nutrientes (López-Otín et al., 2013). Un ejemplo claro de este signo de desregulación con la edad, es la tolerancia a la glucosa. Tanto en ratones como en humanos se ha relacionado el

envejecimiento con un aumento en los niveles de insulina y una pérdida progresiva de la capacidad de eliminación de glucosa, lo cual puede llegar a desencadenar una diabetes tipo II. Además, como la etiología de la diabetes tipo II tiene una base genética relevante, hay estudios epidemiológicos que relacionan haplotipos mitocondriales humanos con la aparición de este trastorno (Poulton et al., 2002), aunque sigue habiendo mucha controversia sobre la significación de estas asociaciones (Chinnery et al., 2007).

Para evaluar si las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB promueven diferencias en la homeostasis de la glucosa, nos centramos en un grupo de animales de 14 meses de edad. No se encontraron diferencias en los niveles de glucosa en sangre en animales no ayunados o sometidos a un ayuno de 6 horas, sin embargo tras 16 horas de ayuno, los animales BL/6^{C57} presentaban niveles de glucosa en sangre significativamente superiores a los de animales BL/6^{NZB}. Este dato sugirió que existen diferencias en la eliminación de glucosa entre los ratones conplásticos a los 14 meses de edad. Para evaluar esta hipótesis, realizamos el test de tolerancia a la glucosa en animales ayunados 6 y 16 horas. En ambas situaciones la eliminación de glucosa era más lenta en los animales con el mtDNA C57BL/6 (*Figura II.17*).

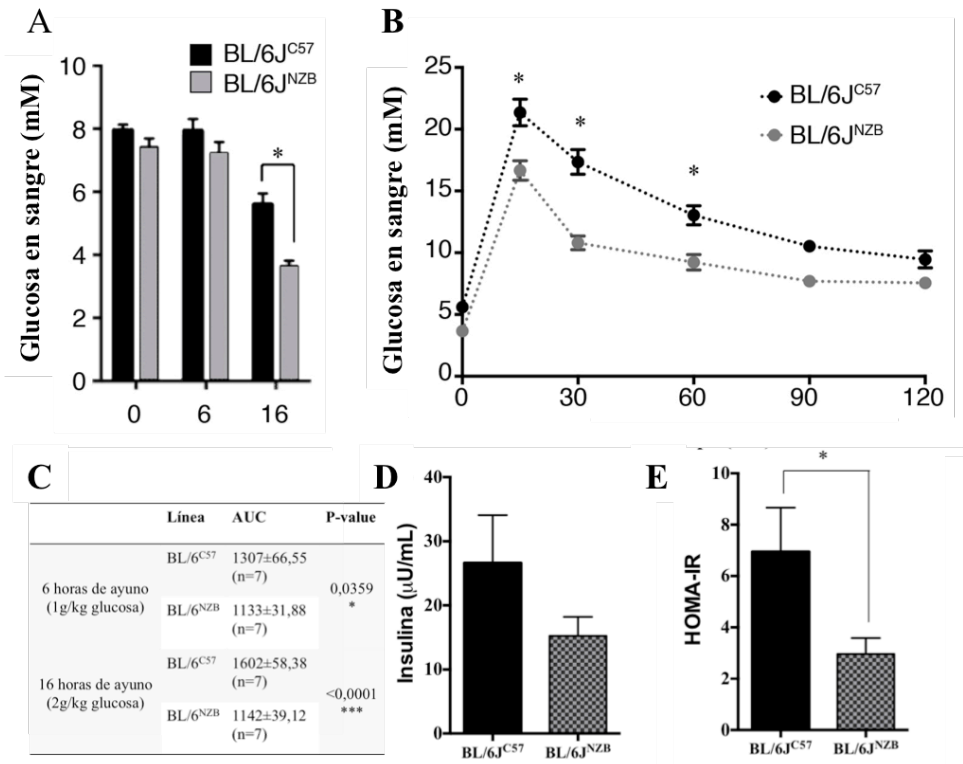


Figura II.17: Evaluación de la homeostasis de glucosa en machos de 14 meses de edad. (A) Niveles de glucosa en sangre en un mismo grupo de animales, sin ayunar y con 6 y 16 horas de ayuno (n=7). (B) Test de tolerancia a la glucosa tras 16 horas de ayuno, e inyectando 2g/kg de glucosa (n=7). (C) Significación del área bajo la curva del test de tolerancia a la glucosa, tras 6 y 16 horas de ayuno. (n=7). (D) Niveles de insulina en plasma tras un ayuno de 16 horas (n=10) p=0.0505. (E) Cálculo del índice HOMA-IR en ayunas (n=10). Media±S.E.M, (*p<0,05, t-test).

Por último, para determinar si la disminución en la velocidad de eliminación de glucosa en los ratones BL/6^{C57} se debía a una mayor resistencia a la insulina, se calculó el índice HOMA-IR (modelo homeostático de evaluación de la resistencia a insulina), mediante la ratio de los niveles de insulina y glucosa tras 16 horas de ayuno. Los ratones BL/6^{C57} presentaban mayores niveles sanguíneos de insulina y un valor significativamente mayor del índice HOMA-IR (*Figura II.17*).

El desarrollo de obesidad, la eliminación de glucosa y la señalización de la insulina en animales adultos, están significativamente influenciados por la variante de mtDNA.

IIB.3 Estudio de la evolución de la función mitocondrial con la edad

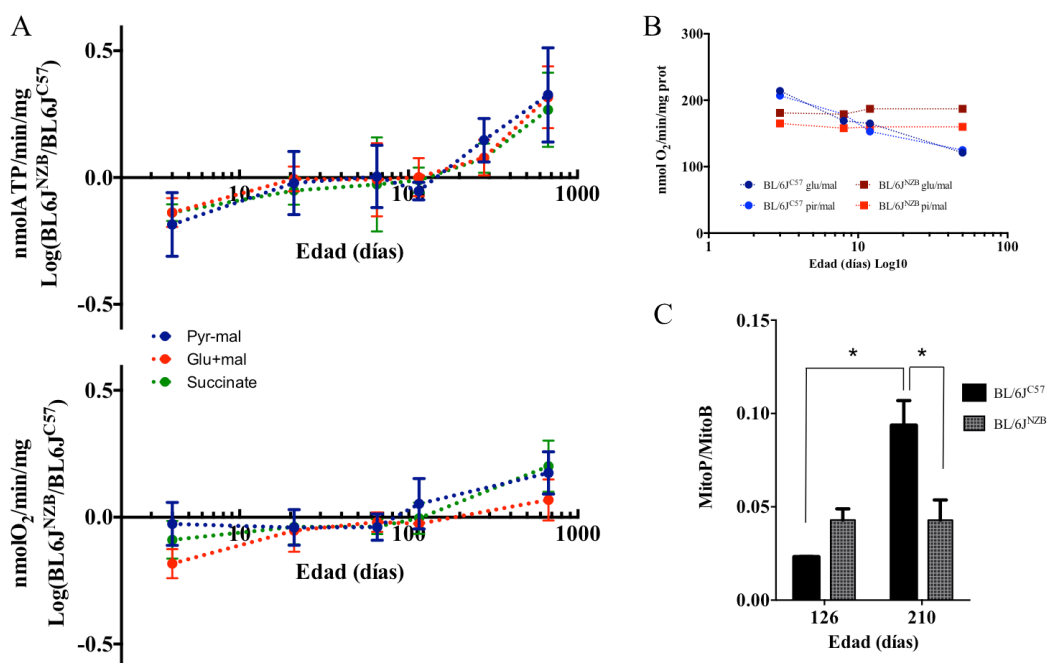
Estudios en numerosas especies evidencian que la eficiencia de la cadena respiratoria tiende a disminuir con la edad, lo cual implica un incremento en la fuga de electrones, mayor producción de ROS y una reducción en la capacidad de síntesis de ATP. Por ello se ha establecido el parámetro de disfunción mitocondrial como uno de los 9 signos que definen el envejecimiento (López-Otín et al., 2013). Así, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si existían diferencias en la función mitocondrial, entre los animales conplásticos BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} a distintas edades, que pudiesen correlacionar con el incremento de los signos de envejecimiento observados en los ratones BL/6^{C57}. Para ello se evaluó la capacidad respiratoria y la producción de ROS mitocondrial a distintas edades.

En primer lugar, se midió el consumo de oxígeno y producción de ATP en mitocondrias aisladas de hígados provenientes de ratones de 4, 21, 65, 115, 280 y 670 días de edad, respectivamente. Por razones meramente técnicas (se necesitan mitocondrias frescas y funcionales, *ver material y métodos*) se evaluó sólo una de las edades por experimento, con 4 animales macho por línea.

No se encontraron diferencias en la capacidad respiratoria entre los animales conplásticos a las edades de 21, 65 y 115 días. Sin embargo en animales de 280 y 670 días, las mitocondrias procedentes de los animales con mtDNA NZB presentaban mejor rendimiento. Por el contrario, en animales de tan solo 4 días de edad, las mitocondrias con el mtDNA C57 presentan mayor capacidad respiratoria (*Figura II.18A*).

Con este experimento ponemos de manifiesto que las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB tienen un impacto significativo en la evolución del rendimiento de OXPHOS con la edad. Para completar el estudio, se analizó en el mismo experimento el consumo de oxígeno en mitocondrias hepáticas aisladas de un animal de cada línea y edad (21, 56, 84 y 350 días). Se

observó que la capacidad respiratoria de las mitocondrias con el mtDNA NZB es similar en todas las edades analizadas, mientras que en el caso del mtDNA C57BL/6 se produce una disminución de la capacidad respiratoria mitocondrial con la edad (*Figura II.18B*).



Además, en concordancia con los resultados de la capacidad OXPHOS, los ratones con el mtDNA C57BL/6 presentan un aumento de la producción de H₂O₂ con la edad. Por el contrario los niveles de H₂O₂ en los animales BL/6^{NZB} se mantenían constantes, pese a que presentaban mayores niveles a edades tempranas (*Figura II.18C*).

Las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB tienen un impacto destacable en la evolución del rendimiento de OXPHOS con la edad.

IIB.4 Análisis de la evolución de la longitud telomérica

La acumulación de daño en el DNA con la edad parece que afecta al genoma de forma aleatoria, sin embargo, hay algunas regiones cromosómicas, como los telómeros, que son particularmente susceptibles al deterioro relacionado con la edad (Vera et al., 2012). Tanto en

humanos como en ratones se ha observado un acortamiento de telómeros con el envejecimiento natural. Para estudiar el alcance de las variantes del mtDNA y su papel en el envejecimiento natural decidimos evaluar la longitud telomérica en los ratones conplásticos.

Para ello se midió la longitud telomérica en folículos pilosos en animales de 12 y 24 meses de edad. En animales de un año de edad la media relativa de la longitud de los telómeros resultó un 11% más larga en los animales BL/6^{C57} (212.7±0.98) que en los BL/6^{NZB} (188.52±1). Sin embargo las diferencias se invirtieron a los dos años de edad, cuando la media de la longitud telomérica es ligeramente superior en los animales BL/6^{NZB} (170.34±0.7) que en los BL/6^{C57} (162.47±1.7). (Figura II.19).

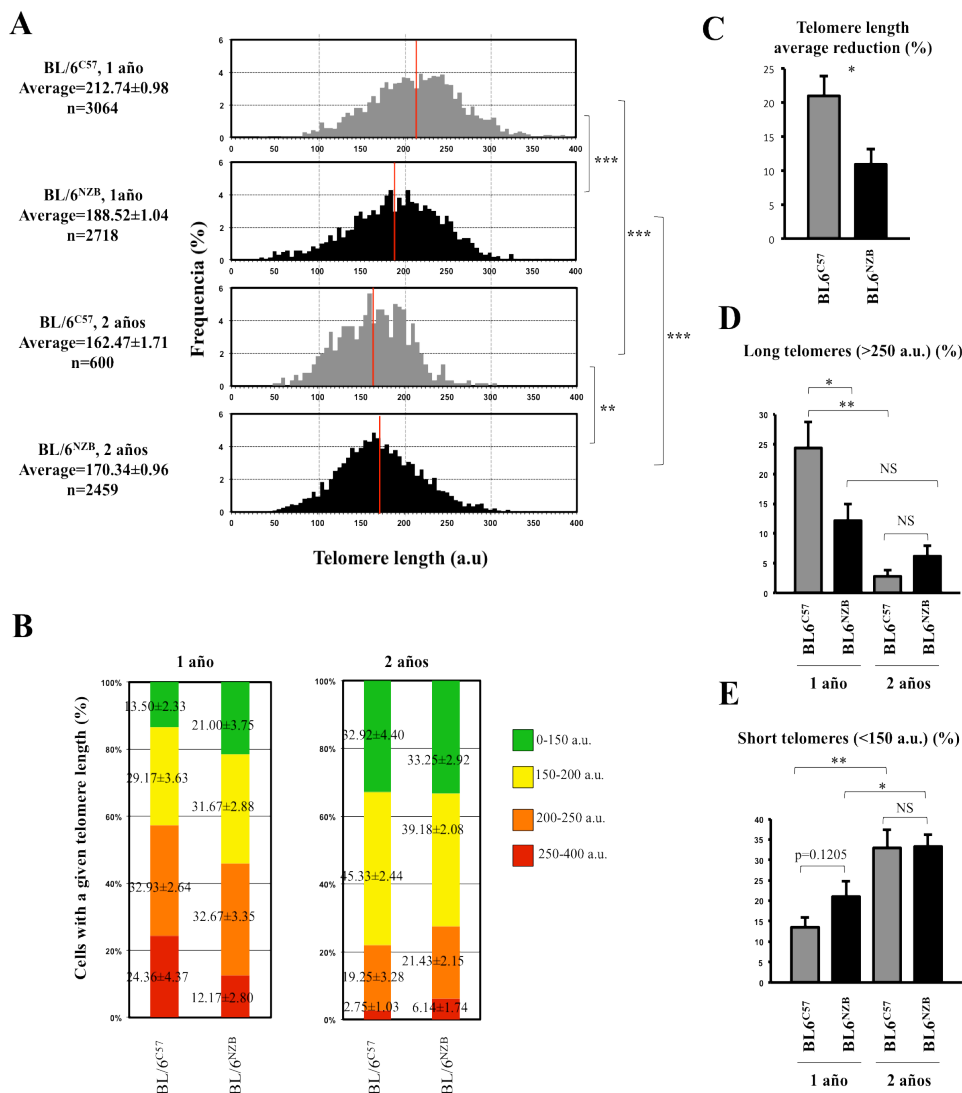


Figura II.19: Longitud de telómeros en células del folículo piloso en ratones BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}. Animales de 1 año de edad (n=6) y 2 años (n=5). (A) Q-FISH histograma mostrando la frecuencia de la fluorescencia de los telómeros. Se indica la media de la fluorescencia de los telómeros y la SD. (B) El panel muestra el porcentaje de células con una longitud telomérica determinada. (C) Reducción media de la longitud telomérica entre los animales de 1 año y 2 años. (D) Porcentaje de células con telómeros largos (>250 a.u.). (E) Porcentaje de células con telómeros cortos (<150 a.u.). Wilcoxon's ram sum (A), t-test (C, D y E) (*p<0,05).

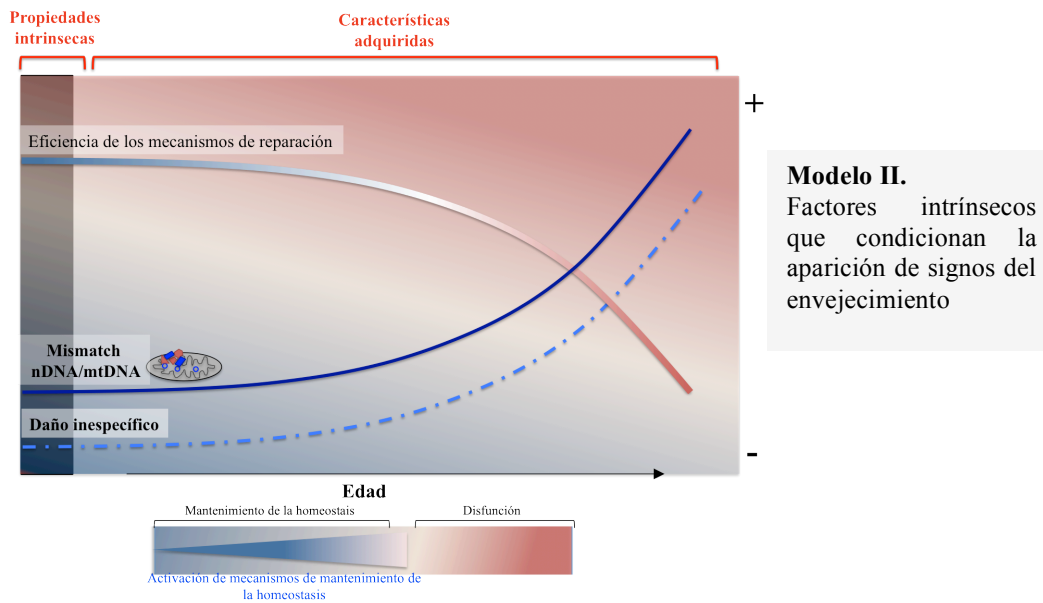
Es decir, a la edad de un año los animales BL/6^{NZB} presentan una media de la longitud telomérica en las células del folículo piloso menor que los animales BL/6^{C57}. Sin embargo, los animales BL/6^{C57} sufren una reducción de la longitud telomérica más dramática desde el año a los dos años de edad.

La evolución de la longitud telomérica en el folículo piloso refuerza las observaciones anteriores que sugieren que el haplotipo del mtDNA NZB cuando se enfrenta a un fondo nuclear C57BL/6 promueve una mejor calidad del envejecimiento con respecto al mtDNA C57BL/6.

IIB.5. Discusión (2)

Los cambios en la actividad metabólica observados en los animales jóvenes (*apartado IIA*) se manifiestan fenotípicamente en los animales adultos. Las diferencias fenotípicas encontradas entre animales conplásticos adultos son muy llamativas: pérdida de la función mitocondrial, incremento en la producción de ROS, propensión a la obesidad, regulación de los niveles de glucosa e insulina y mantenimiento de la longitud telomérica. Todo ello sumado al aspecto externo (pérdida de peso, alopecia, pelo grisáceo, cifosis y aparición de tumores), nos conduce a asociar las variantes de mtDNA con el envejecimiento. Además, en poblaciones humanas se han realizado varios estudios epidemiológicos que asocian ciertos haplotipos de mtDNA con un incremento de la longevidad, así como con la penetrancia de diferentes enfermedades degenerativas (Collerton et al., 2013; Ridge et al., 2012; Tranah et al., 2012).

El envejecimiento se caracteriza por una pérdida de la función, causada por una acumulación de daño inespecífico celular de una manera dependiente de la edad (Vijg and Campisi, 2008). Desde un punto de vista genérico se podría decir que la calidad del envejecimiento estará condicionada por los factores intrínsecos (genes), que determinan tanto el estatus inicial del daño como de los sistemas de reparación del mismo (Trifunovic et al., 2004; Varela et al., 2005), y por factores extrínsecos (ambientales), que determinan la velocidad en la acumulación de daño y de la pérdida de la capacidad de reparación o regeneración. Si retomamos el concepto de “mismatch nDNA/mtDNA”, queda implícito que es una propiedad intrínseca individual determinada por la combinación del genoma nuclear y mitocondrial tras la fecundación. Hemos trabajado con animales cuyo genoma nuclear es idéntico, y bajo las mismas condiciones de estabulación y cría (es decir, mismos factores ambientales), sin embargo la calidad del envejecimiento es diferente entre los animales. Por eso, proponemos que el *mismatch nDNA/mtDNA* es otro factor intrínseco que interviene en la calidad de envejecimiento (*Modelo II*).



Pero, ¿cuáles son los mecanismos por los cuales un determinado *mismatch* puede mejorar la calidad del envejecimiento?

El ajuste estructural y funcional del nDNA/mtDNA determina el balance y concentración de numerosos metabolitos claves celulares (ATP, NAD, FAD, AMP...), así como la producción de ROS. Estos son los factores que han conectado la función/señalización mitocondrial con el envejecimiento (Gomes et al., 2013; Houtkooper et al., 2013; Kujoth et al., 2005; Mitchell et al., 2014; Mouchiroud et al., 2013; Ross et al., 2013; Trifunovic et al., 2004). En la combinación específica de nDNA/mtDNA estudiada en este trabajo, la diferencia genética primaria (introducción del haplotipo del mtDNA NZB en el fondo nuclear C57BL/6) genera un leve empeoramiento en la respiración y en la capacidad de síntesis de ATP, acompañado por un ligero aumento en los niveles de ROS; sin embargo, la actividad mitocondrial es más eficiente en la edad adulta, y los niveles de ROS no se incrementan.

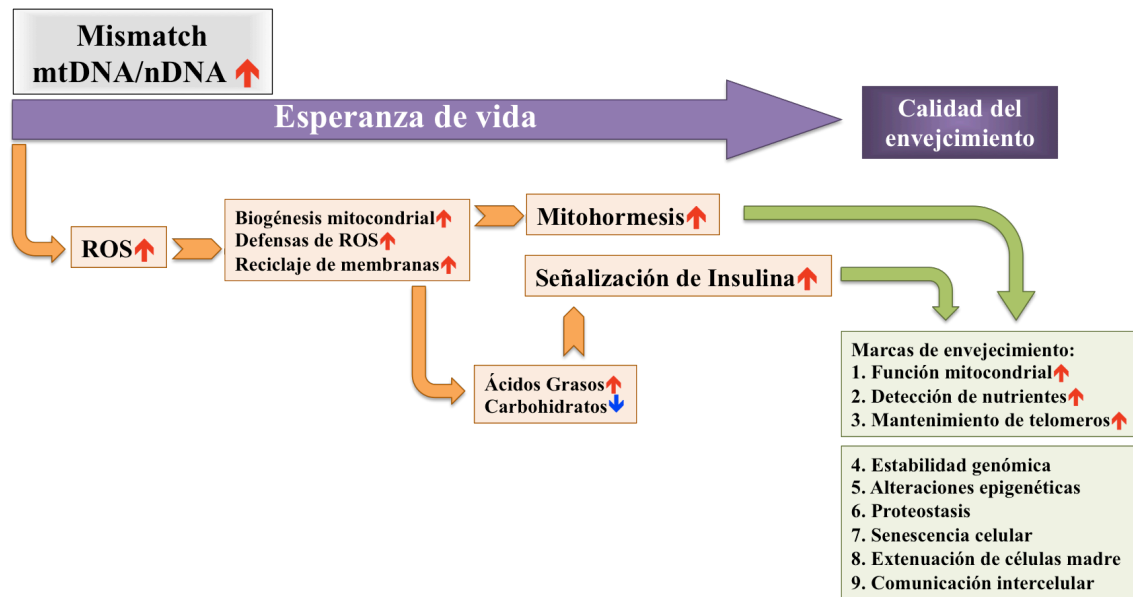
A lo largo de los últimos años ha ido ganando peso la propuesta de “respuesta hormética al estrés”; es decir, la aplicación de niveles moderados de estrés pueden conllevar efectos beneficiosos y la activación de rutas adaptativas de defensa frente a dicho estrés, que pueden llegar a prolongar la vida del individuo (Yun and Finkel, 2014). En *S. Pombe* (Zuin et al., 2010), *C. Elegans* (Cantó et al., 2012) y *D. Melanogaster* (Owusu-Ansah et al., 2013), se ha visto que deficiencias mitocondriales leves inducen longevidad, y, aunque aun no están claros los mecanismos que la regulan, a este fenómeno se le conoce como “Mitohormesis”. Una de las teorías apuntan a que un desequilibrio entre las proteínas mitocondriales y nucleares (Gomes et al., 2013; Houtkooper et al., 2013), es uno de los orígenes de la respuesta adaptativa celular desencadenando: (i) la UPRmt (Mitochondrial Unfolding Protein Response) como una de las posibles respuestas adaptativas para mantener la proteostasis (Jovaisaite et al., 2014) y/o (ii) la

inducción transcripcional de factores de crecimiento insulínicos (IGF), que antagoniza la señalización de la insulina y facilita la mitofagia aumentando la biogénesis de lisosomas (Owusu-Ansah et al., 2013). Los últimos estudios apuntan a que una activación de la UPRmt a edades jóvenes debido a un desequilibrio leve entre las proteínas nucleares y mitocondriales tiene un efecto beneficioso en la calidad de envejecimiento y en la longevidad (Mouchiroud et al., 2013).

Los ratones conplásticos suponen un sistema perfecto para estudiar, sin ningún tipo de modificación externa, ya sea farmacológica o genética, la relevancia del equilibrio entre las proteínas mitocondriales y nucleares en el envejecimiento, ya que enfrentando el mismo fondo nuclear a diferentes variantes de mtDNA obtenemos combinaciones específicas no patológicas que definirán un determinado grado de *mismatch* y por tanto un balance celular metabólico determinado.

En nuestro modelo hemos visto que, en edades jóvenes, los animales BL/6^{NZB} presentan una producción de ROS mitocondrial mayor que los animales BL/6^{C57}, y un incremento en la biogénesis mitocondrial que permite igualar a los segundos en cuanto a la funcionalidad mitocondrial se refiere. Sin embargo, estos niveles basales de ROS más elevados no parecen promover daño oxidativo. Los datos de la transcriptómica y metabolómica del hígado sugieren que un aumento en la expresión de las defensas antioxidantes pueden aminorar el daño oxidativo. En los ratones BL/6^{NZB}, hay evidencias de un mayor remplazo del glutatión y de un aumento en la ratio de reciclaje de membranas, ya que el desequilibrio en algunos lisofosfolípidos apuntan a una mayor actividad de la fosfolipasa A2. Por otro lado, hay una mayor actividad (oxidativa) del metabolismo lipídico a expensas del metabolismo de carbohidratos en los ratones BL/6^{NZB}, que se manifiesta fenotípicamente cuando los animales son alimentados con una dieta alta en grasa y es también evidente cuando se completa el crecimiento del animal, con menor peso y mayor eficiencia de eliminación de la glucosa en sangre. La progresiva alteración de la señalización de insulina en los ratones BL/6^{C57}, alimentados ad libitum, podría desencadenar la disfunción mitocondrial e incrementar los niveles de ROS. Todos estos cambios aceleran la pérdida de la homeostasis del individuo en ratones de edades avanzadas, y explicarían las diferencias tan llamativas en el aspecto de los animales conplásticos. Por último, el acortamiento más acelerado de los telómeros en los ratones BL/6^{C57}, es otra robusta indicación de la pérdida del control de la homeostasis.

Este escenario conecta varios de los signos de envejecimiento (disfunción mitocondrial y producción de ROS, comunicación intercelular, detección de nutrientes y acortamiento de telómeros) con el fenómeno de mitohormesis, y establece una conexión temporal entre ellos (Modelo III).



Modelo III. Mismatch mtDNA/nDNA y envejecimiento

Estos resultados abren una nueva y atractiva línea de investigación: mismatch nDNA/mtNDA-hormesis-envejecimiento.

III. Estudio de la segregación selectiva del mtDNA

In vivo, las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB no son neutras y son capaces de promover diferencias funcionales relevantes a nivel celular, específicas de tejido y determinadas en gran parte por la relación entre la disponibilidad de nutrientes, la integridad de los sistemas celulares y la demanda energética.

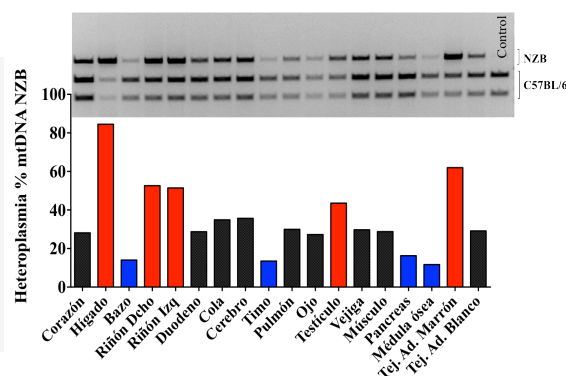
En este apartado nos proponemos evaluar si la segregación selectiva del mtDNA descrita en ratones heteroplásmicos (Jenuth et al., 1997) es debida a las diferencias funcionales promovidas por el mtDNA (*ver antecedentes y objetivos*).

IIIA. Estudio de la segregación selectiva del mtDNA en tejidos somáticos

IIIA.1 Introducción al estudio y descripción de la segregación selectiva del mtDNA

Se generaron ratones heteroplásmicos con un fondo nuclear C57BL/6J conteniendo las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB que denominamos BL/6^{C57-NZB} (*ver material y métodos*). Se analizaron un total de 110 ratones, desde el desarrollo embrionario hasta los 650 días de edad y con niveles de heteroplasma en cola comprendidos entre el 10 y 90% del mtDNA NZB. Se evaluó la segregación del mtDNA en 19 tejidos: (1) músculo cardíaco (ventrículo izquierdo del corazón), (2) hígado, (3) bazo, (4) riñón, (5) duodeno, (6) cola, (7) cerebro, (8) timo, (9) pulmón, (10) ojo, (11) sangre, (12 y 13) testículo u ovario, (14) músculo liso (vejiga urinaria), (15) músculo esquelético (cuádriceps), (16) páncreas, (17) médula ósea, (18) tejido adiposo marrón y (19) tejido adiposo blanco (*Ver ejemplo en Figura III.1*).

Figura III.1: Ejemplo representativo del análisis de heteroplasma en un macho BL/6^{C57-NZB} de 6 meses de edad. Electroforesis horizontal de la RFLP4276 de cada tejido, y cuantificación de las proporciones de cada tipo de mtDNA mediante el software Quantity-One. Control: DNA de C57BL/6



IIIA1.1 Elección de tejido de referencia y establecimiento de una fórmula de análisis

El análisis y comparación de los datos de la heteroplasma presenta dos problemas principales: (i) los niveles de heteroplasma iniciales entre los ratones son variables, y (ii) el nivel de heteroplasma en algunos tejidos no se mantiene constante a lo largo de la vida del animal. Por ello se hace necesario establecer un tejido de referencia cuyos niveles de heteroplasma se mantengan constantes e invariables a lo largo de la vida del animal, y frente al cual poder comparar la evolución de la heteroplasma del tejido problema.

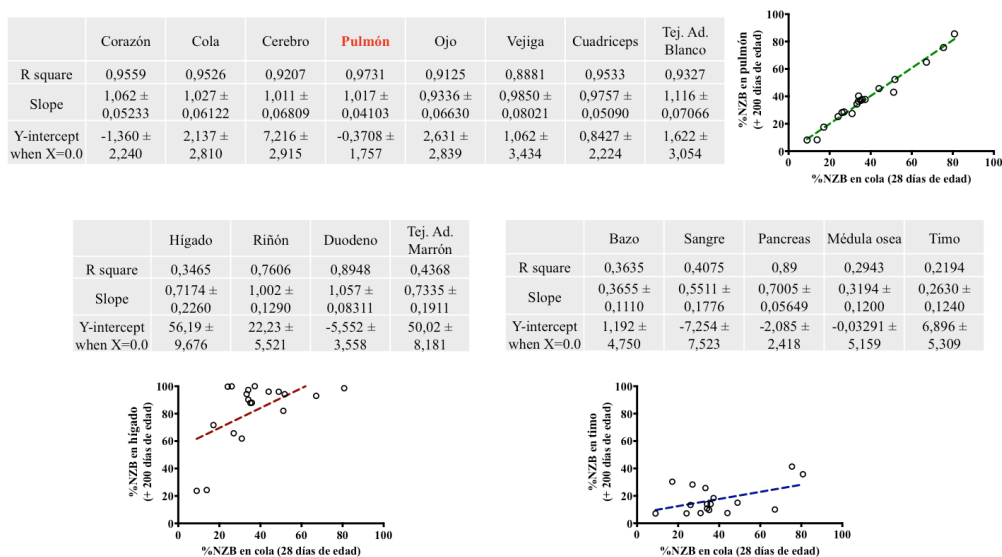


Figura III.2: Elección del pulmón como tejido de referencia de segregación neutra. Correlación lineal entre la heteroplasma en cola del animal a los 28 días de edad y la heteroplasma del tejido problema en el mismo animal con más de 200 días de edad (n=20).

La elección del tejido de referencia se hizo de acuerdo a los siguientes criterios: en un grupo de 20 animales de más de 200 días de edad, se calculó la correlación entre la heteroplasma de cada uno de los tejidos frente a la heteroplasma en cola presente en el mismo animal a los 28 días de edad, y se eligió el tejido que mejor ajustase a una correlación lineal, con pendiente igual a 1, ordenada en el origen igual a 0 y cuyo coeficiente de correlación fuese más cercano a 1 (*Figura III.2*): el resultado fue el pulmón.

Usando el pulmón como tejido de referencia se transformó el valor de la heteroplasma de cada tejido atendiendo a la siguiente fórmula matemática:

$$Ht = -\ln(((1/h)-1)*(h_o/(1-h_o)))$$

ht= heteroplasma transformada

h= %NZB en el tejido problema

h₀= %NZB en el tejido de segregación neutra (i.e pulmón)

De este modo, si:

ht>0; selección del mtDNA NZB

ht=0; no hay selección

ht<0; selección del mtDNA C57BL/6

La ventaja de utilizar esta fórmula frente a la ratio de la diferencia de heteroplasma entre tejidos, radica en que se tienen en cuenta los niveles de heteroplasma iniciales y por tanto, la capacidad de cambio (*Tabla III.1*).

h ₀	h	Ratio	Ht
30	60	2,00	1,25
10	15	1,50	0,46
85	90	1,06	0,46
50	55	1,10	0,20
50	45	0,90	-0,20
60	30	0,50	-1,25

Tabla III.1: Ejemplos de transformación de la heteroplasma aplicando la fórmula $Ht = -\ln(((1/h)-1)*(h_0/(1-h_0)))$. Nótese que, a diferencia del cálculo de la ratio, la magnitud absoluta del cambio es la misma independientemente de la dirección de selección, además se tiene en cuenta la capacidad total de selección atendiendo a la heteroplasma inicial.

III A1.2 Descripción del comportamiento de segregación selectiva del mtDNA

En los 110 animales analizados, se transformó la heteroplasma de cada tejido teniendo en cuenta la heteroplasma presente en el pulmón del animal, y se representó dicho valor en función de la edad del animal (*Figura III.3*). De este modo se ha observado que:

i) A lo largo de la vida postnatal del animal, pero no durante el desarrollo embrionario, existen tres tipos de comportamiento diferenciados en la **selección** del mtDNA según los tejidos analizados:

- Selección de NZB: hígado, riñón, tejido adiposo marrón, testículo, cerebro y tejido adiposo blanco.
- Selección de C57BL/6: médula ósea, bazo, timo, sangre, páncreas, ovario y duodeno.
- No hay selección: ventrículo izquierdo, músculo esquelético, vejiga, cola, pulmón y ojo.

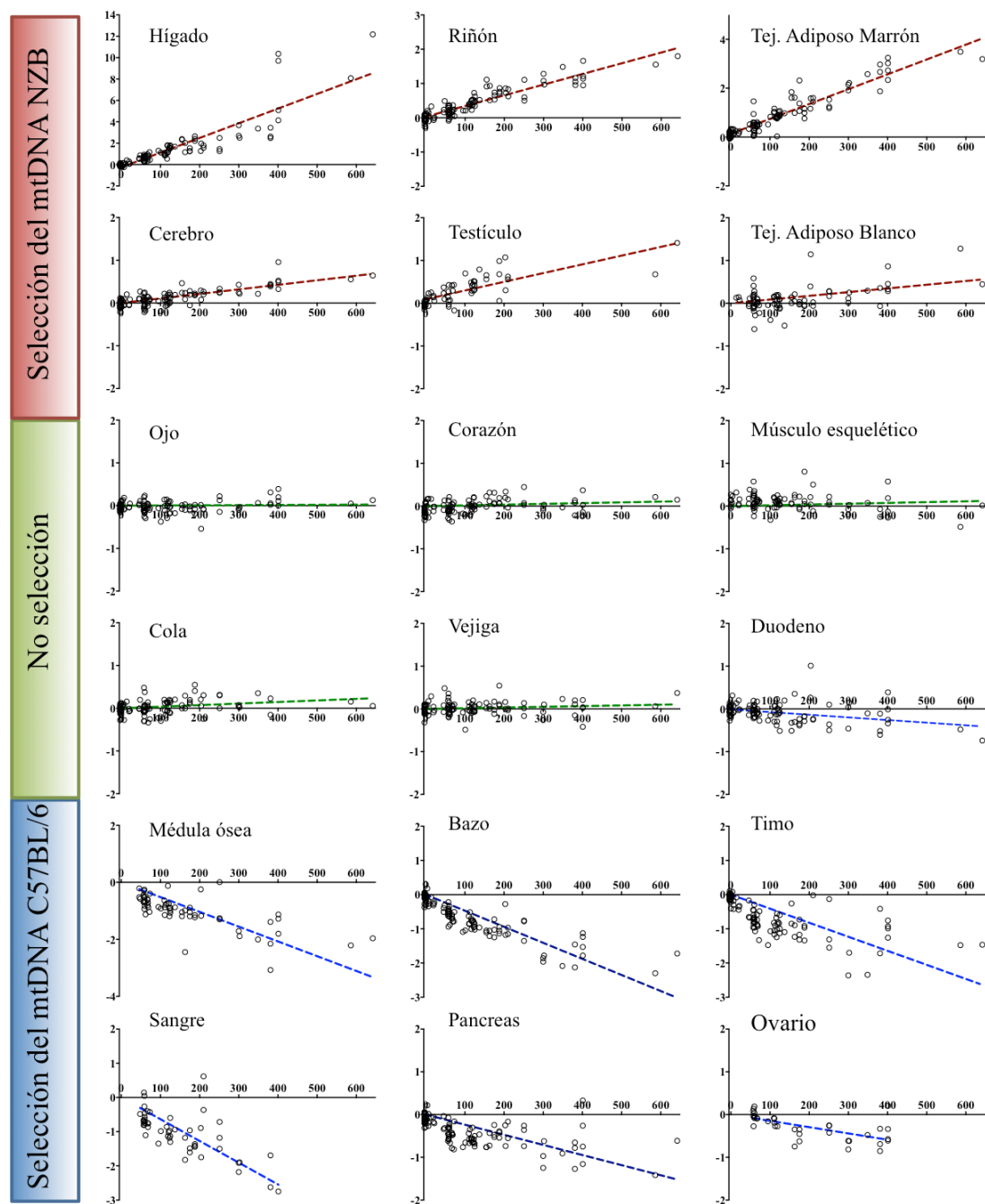


Figura III.3: Segregación del mtDNA en 18 tejidos de ratones BL/6^{C57-NZB}. Representación de la heteroplasmia transformada de cada tejido usando el pulmón como representante de tejido de segregación neutra (ordenadas) en función de la edad del animal (abscisas). 110 animales analizados desde el día 15 del desarrollo embrionario hasta los 642 días de edad (50 machos, 44 hembras y 16 sin determinar).

ii) La **dirección de selección** es específica de tejido e independiente de la heteroplasmia inicial, aunque la proporción del mtDNA seleccionado sea baja.

iii) La intensidad de selección:

- Es característica de cada tejido.
- Es constante a lo largo de la vida del animal en el hígado, riñón, cerebro y tejido adiposo marrón, hasta alcanzar el 100% de NZB (Figura III.4A).
- No es constante en médula ósea, bazo, timo y páncreas, donde la intensidad de selección disminuye con la edad del animal y nunca se llega a eliminar completamente el mtDNA NZB (Figura III.4B).
- En algunos tejidos la intensidad de selección correlaciona con los niveles de heteroplasma iniciales (Figura III.4C).

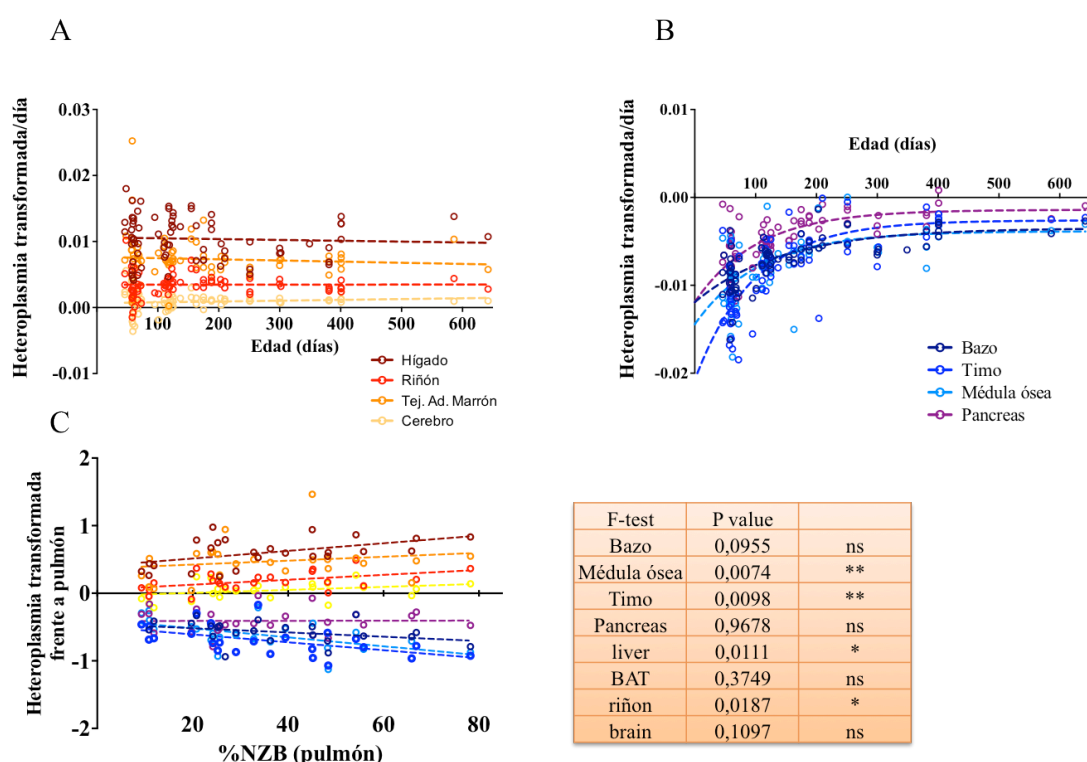


Figura III.4: Características de la intensidad de selección. (A y B) Representación del ratio entre la heteroplasma transformada y la edad del animal (ordenadas) frente a la edad del animal (abscisas) en diferentes tejidos. El hígado, riñón, tejido adiposo marrón y cerebro presentan una selección del mtDNA NZB constante a lo largo de la vida del animal. El bazo, timo, médula ósea y páncreas sufren la gran mayoría de la selección del mtDNA C57BL/6 durante los dos primeros meses de vida. (C) Representación de la intensidad de selección (heteroplasma transformada), frente a los niveles de heteroplasma iniciales (% de NZB en pulmón) de 25 animales de 45 a 70 días de edad. A la derecha se muestra el p valor tras aplicar un test-F para valorar si la pendiente es diferente a 0. En la médula ósea y timo la intensidad de selección es inversamente proporcional a los niveles de heteroplasma del mtDNA seleccionado. En el hígado y riñón la intensidad de selección es directamente proporcional a los niveles de heteroplasma del mtDNA seleccionado.

En conclusión, 12 de 19 tejidos analizados en ratones heteroplásmicos BL/6^{C57-NZB} presentan una selección del mtDNA en una dirección determinada y fija. La dirección de dicha selección es específica del tejido, mientras que la intensidad de selección es dependiente del tejido, de la edad del animal y de los niveles de heteroplasma iniciales.

IIIA.2. Modulación de la segregación selectiva del mtDNA

Hemos demostrado que las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB promueven diferencias funcionales *in vivo*, ahora queremos esclarecer si la segregación selectiva del mtDNA es debida a estas diferencias.

Postulamos que, si el origen de la segregación selectiva del mtDNA es debida a las diferencias en la funcionalidad de la mETC promovidas por el *mismatch nDNA/mtDNA*, modificaciones en la funcionalidad o en el resultado de la interacción, podrían cambiar la intensidad de segregación. Por ello, analizamos como se comporta la segregación en condiciones en las que modulamos:

- (i) La funcionalidad mitocondrial: mediante cambios en la disponibilidad de sustratos o cambios en los requerimientos metabólicos celulares
- (ii) Las consecuencias del *mismatch nDNA/mtDNA*: mediante cambios en los niveles de ROS.

IIA.2.1 Disponibilidad de nutrientes

Para evaluar esta primera hipótesis, se empezó estudiando la segregación del mtDNA en fibroblastos heteroplásmicos inmortalizados en cultivo. Para ello se generaron tres líneas de fibroblastos inmortalizados provenientes de MEFs de tres embriones de diferentes camadas con una heteroplasma en piel de 40-50% de mtDNA NZB (*ver material y métodos*). Durante 40-60 días se mantuvieron los cultivos celulares siguiendo la evolución de la heteroplasma en tres condiciones diferentes: 25mM Glucosa, 5mM Glucosa y 5mM Galactosa.

En las tres líneas de fibroblastos heteroplásmicos analizados, en 60 días de cultivo, con el medio de fibroblastos habitual (25mM Glucosa) los niveles de heteroplasma se mantuvieron constantes, pero, sorprendentemente, con una concentración 5mM glucosa se acumulaba progresivamente el mtDNA NZB, mientras que con 5mM galactosa se seleccionaba el mtDNA C57BL/6 (*Figura III.5 A y B*). De este modo se demuestra que la segregación selectiva del mtDNA está influenciada por la fuente de carbono proporcionada.

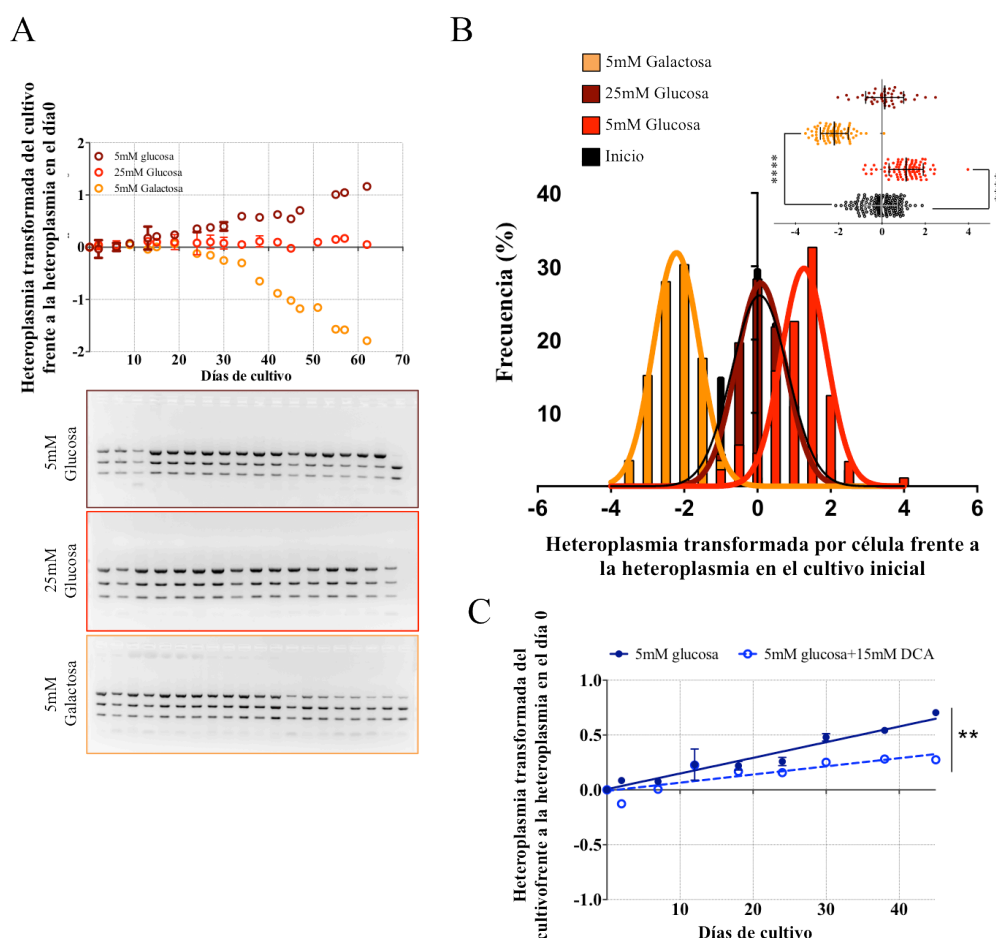


Figura III.5: Segregación del mtDNA *in vitro*. (A) Representación de la heteroplasma transformada respecto a la heteroplasma inicial (día 0) de fibroblastos heteroplásmicos cultivados con 25mM Glucosa, 5mM Glucosa y 5mM Galactosa durante 62 días (n=3, para cada condición). En la parte inferior se muestran tres geles representativos de la evolución de la heteroplasma en cada una de las condiciones. (B) Representación de la frecuencia relativa y distribución normal (%) de la heteroplasma transformada de células individuales de los cultivos celulares tras 60 días con 5mM Glucosa (R=0,9390), 5mM galactosa (R=0,9968) y 25mM Glucosa (R=0,9744) (n=80-120 para cada condición). En negro se representa la frecuencia relativa de la población celular al inicio del experimento (R= 0,9259). Arriba a la derecha, representación de los valores individuales de cada medida (****p<0,0001, t-test) . (C) Representación de la heteroplasma transformada respecto a la heteroplasma inicial (día 0) de fibroblastos heteroplásmicos cultivados con 5mM Glucosa en presencia (línea continua) y ausencia de 15mM DCA (línea discontinua). n=2, para cada condición. (**p<0,01, F-test, pendiente).

Puesto que, en células en cultivo la fuente de carbono suministrada y la concentración de la misma, influyen en la segregación del mtDNA, se decidió evaluar el comportamiento de segregación *in vivo*, en un grupo de 25 animales heteroplásmicos alimentados con una dieta grasa (HFD, 20% carbohidratos, 20% proteínas y 60% grasa) desde el destete hasta los 6 meses de edad. Sólo el tejido adiposo blanco y el duodeno mostraron un comportamiento de segregación diferencial significativo respecto a los controles: una dieta con alto contenido en grasa favorece la selección del mtDNA NZB en el duodeno, y la selección del mtDNA C57BL/6 en el tejido adiposo blanco (Figura III.6).

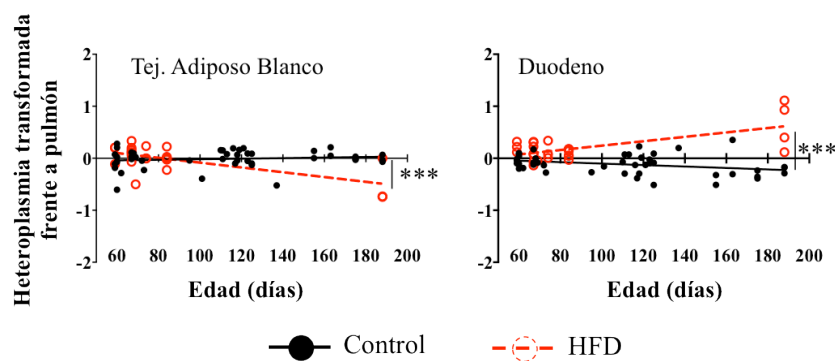


Figura III.6: Segregación del mtDNA y HFD. Representación de la heteroplasma transformada del duodeno y del tejido adiposo blanco usando el pulmón como representante de segregación neutra (ordenadas) en función de la edad del animal (abcisas). En negro los datos de los animales alimentados con dieta control (5K67LabDiet); en rojo con dieta grasa (HFD, D12492 Open Source Diets) desde el destete. (***) $p < 0.001$, F-test, pendiente).

La fisiología del organismo es compleja, y, aunque se cambien las proporciones de nutrientes en la dieta, la aportación de los distintos nutrientes a los diferentes tipos celulares está muy bien regulada y tiende a ser compensada. Por eso, se decidió administrar compuestos que forzaran a nivel celular la disponibilidad de los sustratos. Se optó por el dicloroacetato de sodio (DCA) por dos razones: (i) por su mecanismo de acción: el piruvato es una de las moléculas claves en la regulación de flujo metabólico celular, y el DCA, mediante la inhibición de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) con la subsecuente activación del complejo de la Piruvato Deshidrogenasa (PDH), favorece la descarboxilación del piruvato y la formación de acetil-CoA. (ii) por su distribución: el DCA entra rápidamente en la circulación general tras la administración oral, siendo transportado a través de las membranas celulares por transportadores de monocarboxilatos.

Antes de realizar los experimentos *in vivo*, se evaluó el efecto del DCA en fibroblastos heteroplásmicos en cultivo. Para ello, se cultivaron dos de las líneas celulares con un medio 5mM glucosa y 5mM glucosa+15mM DCA durante 45 días, y tal y como hicimos en los experimentos anteriores, estudiamos la evolución de la heteroplasma en el cultivo. En ambas líneas celulares, la presencia de DCA en el medio, aminoró la acumulación del mtDNA NZB (Figura III.5C).

In vivo, el experimento se realizó con 22 machos heteroplásmicos, empezando el tratamiento con DCA (1g/L en agua de bebida) a los 50 días de edad; y se evaluó la heteroplasma en los diferentes tejidos de los animales desde los 60 hasta los 160 días de edad.

El tratamiento con DCA modificó de manera muy significativa la segregación del mtDNA en hígado, en tejido adiposo marrón, duodeno y cerebro. En hígado y duodeno la intensidad de selección del mtDNA NZB se vio notablemente incrementada con el tratamiento de DCA y por

el contrario, en el tejido adiposo marrón y cerebro, la administración de DCA detuvo la segregación del mtDNA NZB, manteniendo constantes los niveles de heteroplasma presentes antes de empezar el tratamiento (Figura III.7).

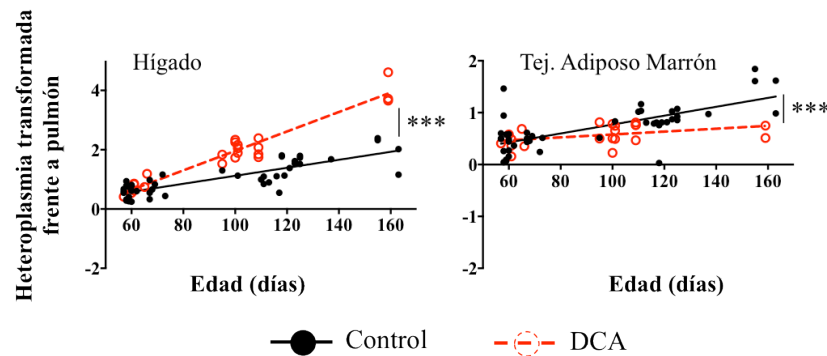


Figura III.7: Segregación del mtDNA y DCA. Representación de la heteroplasma transformada del hígado y tejido adiposo marrón usando el pulmón como representante de segregación neutra (ordenadas) en función de la edad del animal (abscisas). En negro los datos de los animales sin tratamiento; en rojo con DCA en agua de bebida (1g/L) desde los 50 días de edad. (***) $p < 0.001$, F-test, pendiente).

IIA.2.2 Consecuencias funcionales: ROS

Las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB inducen diferencias en la producción de H_2O_2 mitocondrial *in vitro* (Moreno-Loshuertos et al., 2006) e *in vivo* (apartado II). Con base en estos resultados previos, se evaluó si las diferencias en la producción de ROS influían en la segregación selectiva del mtDNA, mediante la administración de NAC en agua de bebida (1g/L) desde los 50 días de edad en 12 ratones heteroplásmicos, y se midió la heteroplasma en los diferentes tejidos desde los 96 hasta los 273 días de edad.

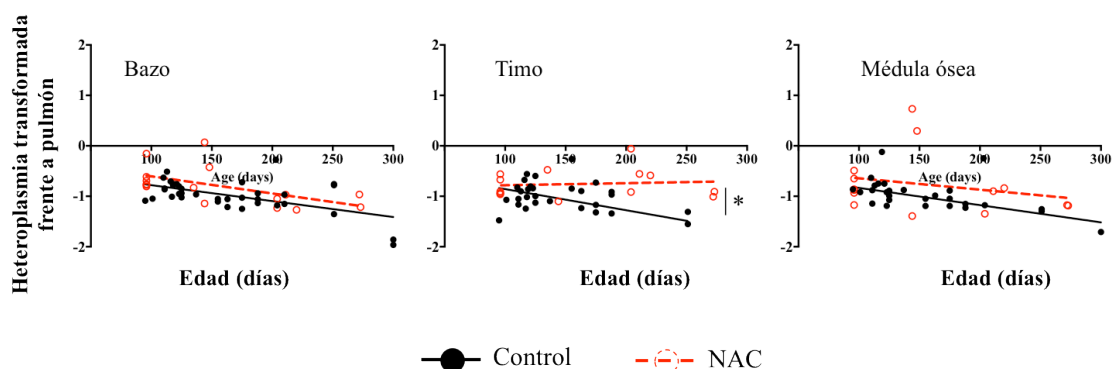


Figura III.8: Segregación del mtDNA y NAC. Representación de la heteroplasma transformada del bazo, timo y médula ósea usando el pulmón como representante de segregación neutra (ordenadas) en función de la edad del animal (abscisas). En negro los datos de los animales sin tratamiento; en rojo tratados con NAC en agua de bebida (1g/L) desde los 50 días de edad (* $p < 0.05$, F-test, pendiente).

La administración de NAC modificó la segregación del mtDNA en el tejido adiposo marrón y en los tejidos hematopoyéticos. En el tejido adiposo marrón la acumulación del mtDNA NZB se vio aminorada significativamente. En el bazo, médula ósea y sangre se atenuó la segregación del mtDNA C57BL/6, llegando a detener en el timo (*Figura III.8*).

A modo de resumen, la modulación del metabolismo energético celular tiene un impacto en la intensidad de selección del mtDNA principalmente en el hígado, duodeno, cerebro, y tejido adiposo marrón. Mientras que los ROS juegan un papel relevante en la segregación del mtDNA en los tejidos hematopoyéticos y en el tejido adiposo marrón. En la *Figura III.9* se recoge el resumen de la intensidad de segregación en todos los tejidos en función del tratamiento recibido.

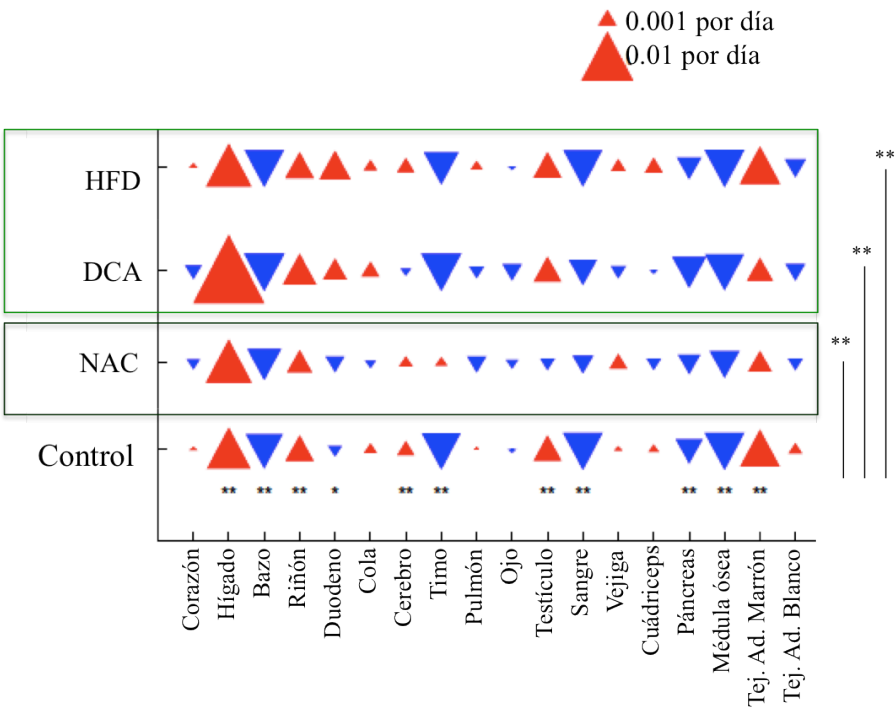


Figura III.9: Resumen de los patrones de segregación. (*Fila Control*) Ratio de segregación deducida en cada tejido. Los triángulos rojos indican segregación con acumulación del mtDNA NZB, los azules indican acumulación del mtDNA C57BL/6. El tamaño del triángulo está relacionado con la magnitud de la selección inferida. Intervalos de confianza por el método de bootstrapping después de la corrección de Bonferroni (* $p < 0.05$). (*Otras filas*) Ratios de segregación inferidos en cada tejido tras diferentes tratamientos. A la derecha se muestran las diferencias significativas del conjunto de datos de cada tratamiento frente al conjunto de datos del control (likelihood ratio test, **($p < 0.01$), después de la corrección de Bonferroni).

IIIA.3. Evaluación del nivel de selección: intra- o inter- celular

Pese a los esfuerzos realizados por numerosos grupos de investigación en el campo de la segregación del mtDNA, los mecanismos que gobiernan la acumulación selectiva de las variantes de mtDNA siguen siendo desconocidos (Jokinen and Battersby, 2013).

Hasta el año 2006, en el cual se demostró que las variantes de mtDNA murinas son capaces de promover diferencias funcionales (Moreno-Loshuertos et al., 2006), se consideraba que las variantes de mtDNA de ratón eran neutras. Por ello se proponía que los mecanismos que gobiernan la segregación tenían que estar directamente relacionados con la molécula de mtDNA por medio de procesos implicados en el mantenimiento del mtDNA, como proteínas nucleares específicas de tejido que afectan a la estructura, la expresión, la replicación o a sistemas de reparación del mtDNA (Battersby and Shoubridge, 2001; Battersby et al., 2003).

En el apartado anterior, hemos visto que la acumulación selectiva del mtDNA está fuertemente condicionada por las diferencias funcionales de la mETC, por lo tanto, la selección puede ser intracelular a nivel del orgánulo, o intercelular por competencia entre células.

IIIA3.1 Evaluación de la segregación intracelular

La selección intracelular, mediante la dinámica mitocondrial, es actualmente la hipótesis más popular para explicar la segregación selectiva del mtDNA. Son varios los trabajos que, haciendo uso de modelos celulares heteroplásmicos para un mtDNA mutante, defienden que bajo condiciones de estrés, se induce una fragmentación mitocondrial que permite una segregación de mitocondrias dañadas o mitofagia selectiva, lo que conlleva a la segregación selectiva del mtDNA (Malena et al., 2009) (Dai et al., 2014).

Para evaluar si los mecanismos de fragmentación y eliminación de mitocondrias dañadas tras un estrés mitocondrial están implicados en el proceso de segregación en los ratones BL/6^{C57-NZB}, se generaron en laboratorio los ratones heteroplásmicos Knock-out para la peptidasa OMA1 (*ver material y métodos*). OMA1 es una peptidasa que media la degradación de las formas largas de OPA1 en la membrana interna mitocondrial en respuesta a diferentes tipos de estrés celular, participando así en la modulación de la fragmentación como respuesta a dichas situaciones (Anand et al., 2014; Baker et al., 2014; Quirós et al., 2012).

Se analizó la heteroplasmia en los diferentes tejidos de 8 ratones BL/6^{C57-NZB} OMA1^{-/-} desde los 47 a los 212 días de edad. Tanto la intensidad como la dirección de segregación coincidía a la perfección con los animales BL/6^{C57-NZB} en todos los tejidos analizados. En la figura III.11 se muestran como ejemplos representativos el hígado, el cerebro y el timo (*Figura III.10*).

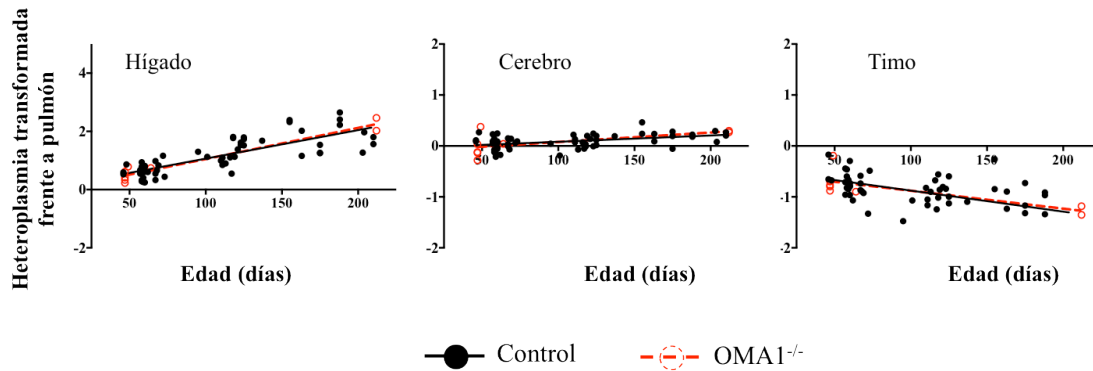


Figura III.10: Segregación del mtDNA y OMA1. Representación de la heteroplasma transformada del hígado, cerebro y timo usando el pulmón como representante de segregación neutra (ordenadas) en función de la edad del animal (abscisas). En negro los datos de los animales BL/6^{C57-NZB}; en rojo los de animales BL/6^{C57-NZB} OMA1^{-/-}.

Podemos concluir que la pérdida de la proteasa OMA1, y por tanto, la pérdida de los mecanismo inducidos por estrés mitocondrial que de ella dependen no altera la segregación selectiva del mtDNA en ratones BL/6^{C57-NZB}. Estos resultados sugieren que la heteroplasma no parece inducir estrés mitocondrial.

IIIA 3.2 Evaluación de la segregación intercelular

Hasta ahora, todos los estudios y propuestas de la segregación selectiva de las variantes de mtDNA han sido considerados desde un punto de vista intracelular, ya sean a nivel del mtDNA o de la mitocondria. En este apartado nos proponemos evaluar si las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB pueden conferir diferencias a nivel celular, es decir, ¿puede la competición intercelular estar implicada en la selección de un determinado mtDNA en los diferentes tejidos?

IIIA.3.1 Heterogeneidad celular

Para que tenga lugar una selección del mtDNA a nivel celular se tienen que cumplir varias condiciones: los niveles de heteroplasma entre las células tienen que ser distintos y tienen que conferir diferencias funcionales relevantes.

(i) *Hay diversidad en los niveles de heteroplasma entre los fibroblastos embrionarios provenientes del mismo embrión.* Tras cuatro pases en cultivo de los MEFs desde su aislamiento (provenientes de un embrión heteroplásmico de 13.5 d.p.c), se subclonaron las células y se midió la heteroplasma en las colonias provenientes de una sola célula. El promedio de los niveles de la heteroplasma de los clones analizados, correspondía con la heteroplasma del cultivo celular global y con la heteroplasma en piel del embrión del cual habían sido aislados

los MEFs. Pero existía una amplia variabilidad en los niveles de heteroplasma entre los clones analizados (*Figura III.11A*). Se eligieron los clones más próximos a la homoplasma para una de las variantes de mtDNA y se establecieron nuevas líneas celulares (todas las líneas celulares provienen del mismo pool de MEFs y por tanto del mismo embrión) (*Figura III.11B*).

(ii) *Hay diferencias funcionales entre las células con diferentes niveles de heteroplasma.* Como la segregación en las células heteroplásmicas era diferente en presencia de glucosa o galactosa; se calculó el tiempo de duplicación celular en 5mM glucosa y 5mM galactosa de 9 líneas celulares con más de un 70% de mtDNA NZB y 9 líneas con menos de un 20% de mtDNA NZB. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las células con 5mM Glucosa entre ambos grupos. Sin embargo, con un medio 5mM galactosa el crecimiento se veía moderadamente afectado en todas las líneas celulares, pero este empeoramiento era significativamente más acusado en las células con mayor contenido de mtDNA NZB (*Figura III.11C*).

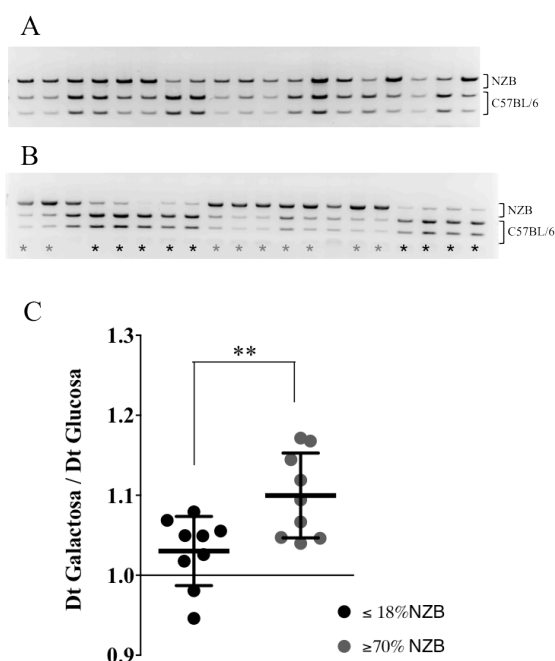


Figura III.11: Heterogeneidad celular y funcional en los cultivos de MEFs heteroplásmicos. (A) gel representativo de los niveles de heteroplasma de clones celulares provenientes de fibroblastos de un mismo embrión. (B) gel mostrando la heteroplasma de las líneas celulares establecidas a partir de clones provenientes del mismo embrión (C) ratio del tiempo de duplicación en 5mM galactosa vs. 5mM glucosa de líneas celulares con alto y bajo contenido de mtDNA NZB (n=9). (*p<0.05, t-test)

Con este experimento revelamos que células con diferentes niveles de heteroplasma, procedentes del mismo individuo, presentaban diferencias funcionales dependiendo del metabolismo energético. Y confirmamos los resultados publicados previamente (Moreno-Loshuertos et al., 2006), aunque en nuestro caso, con líneas celulares provenientes del mismo individuo y por tanto uniformes en cuanto al fondo genético nuclear se refiere.

(iii) *La heteroplasma genera un nuevo contexto celular:* Puesto que la presencia de una u otra variante de mtDNA en el mismo fondo nuclear (*ver apartado IIA*), induce cambios globales en la firma transcriptómica celular, se evaluó si la heteroplasma es capaz de inducir un nuevo

contexto celular. Para ello se analizaron por RNAseq muestras de hígado de ratones hetroplásmicos de 10 semanas de edad, paralelamente con el análisis de las muestras de los animales conplásticos.

De este modo, se comparó el perfil transcriptómico en hígado de machos de 12 semanas de edad: BL/6^{C57}, BL/6^{NZB} y BL/6^{C57-NZB} y se reveló que la condición de heteroplasma induce una respuesta particular y diferencial respecto a las líneas homoplásmicas (Figura III.12).

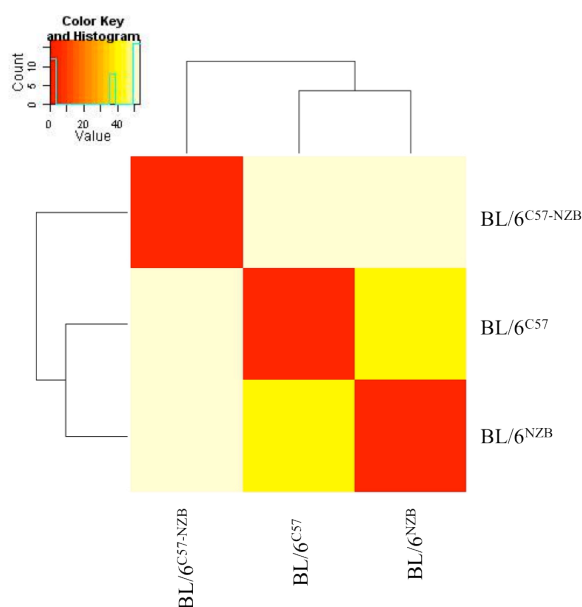


Figura III.12 Agrupación jerárquica del RNAseq del hígado de ratones heteroplásmicos frente a los conplásticos. Matriz de distancias del log₂ de la expresión normalizada de los niveles promediados sobre todos los replicados para todos los genes detectados usando RNA-Seq.

IIIA.3.2 Selección del mtDNA en ratones quiméricos mitocondriales

Para evaluar *in vivo* si se podía explicar parte de la segregación selectiva del mtDNA por un fenómeno de competencia o ventaja celular, se generaron los ratones quiméricos mitocondriales (*ver material y métodos*). Estos ratones se caracterizan por contener las dos variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB en un fondo nuclear C57BL/6. Pero, a diferencia de los ratones heteroplásmicos, en este caso las variantes de mtDNA se encuentran en homoplasma. Es decir, el individuo está compuesto por células con el mtDNA C57BL/6 o con el mtDNA NZB exclusivamente.

Se estudió el comportamiento de selección del mtDNA en 14 tejidos (hígado, riñón, tejido adiposo marrón, cerebro, bazo, timo, páncreas, duodeno, corazón, músculo esquelético, vejiga, ojo, pulmón y cola) de 16 ratones quiméricos neonatos y 35 ratones de 60 a 100 días de edad. Como el fondo nuclear de las células es idéntico, se estimó el quimerismo mitocondrial de cada tejido por medio de la RFLP4276 del mtDNA y se normalizó aplicando la fórmula $H_t = -\ln(((1/h)-1)*(h_0/(1-h_0)))$, donde h = quimerismo en el tejido problema, y h_0 = promedio del quimerismo en los 14 tejidos analizados.

En ninguno de los tejidos analizados, tanto de animales neonatos como adultos, se encontraron indicios de una selección específica de células con las variantes de mtDNA. (Figura III.13A).

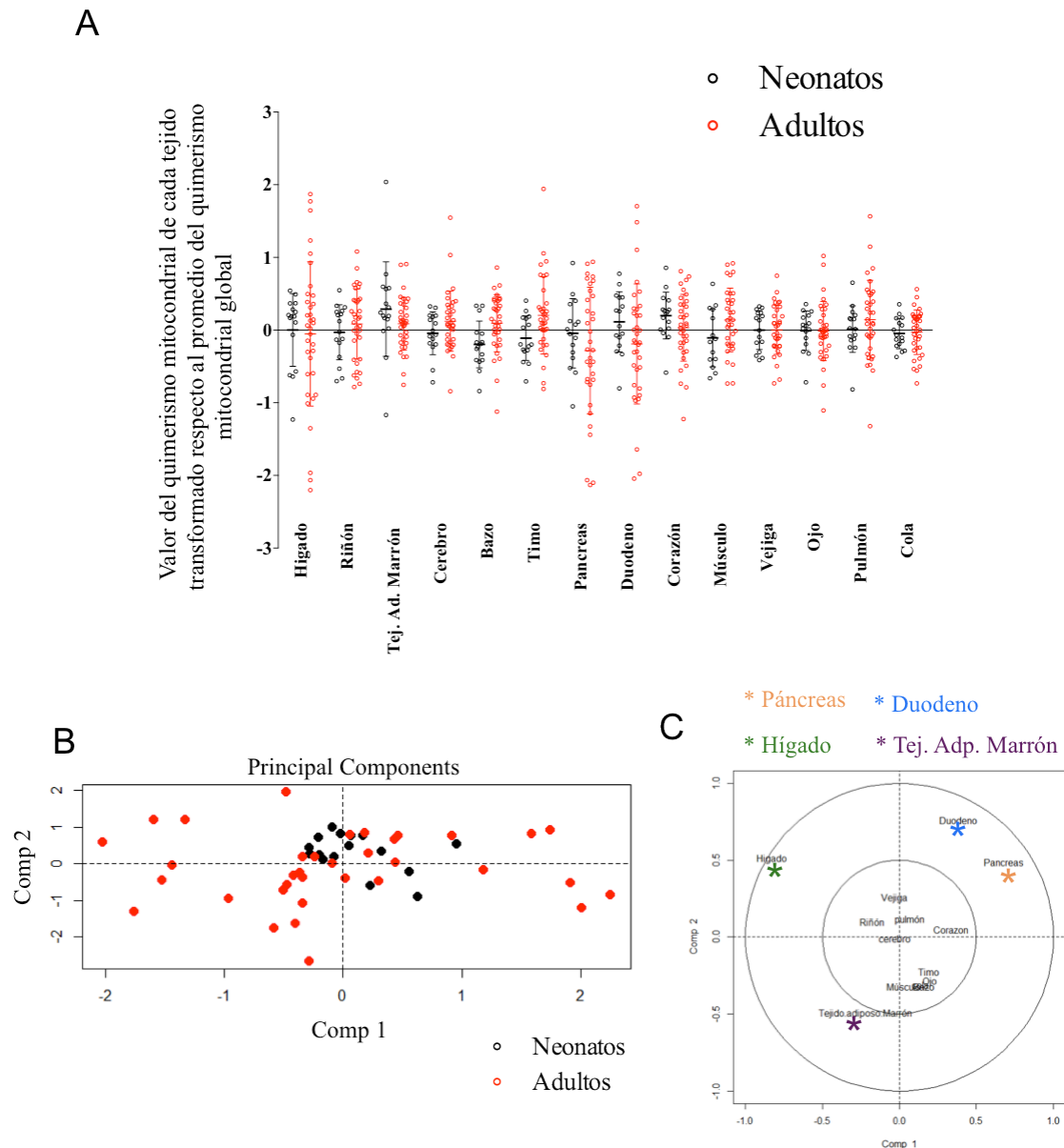


Figura III.13: Selección del mtDNA en ratones quiméricos mitocondriales. (A) Representación de los valores de quimerismo mitocondrial por tejido transformados respecto al promedio de quimerismo mitocondrial de los 14 tejidos analizados en cada individuo. En negro se representan los animales neonatos (n=16), y en rojo animales de 60 a 100 días de edad (n=35). (0= no selección, >0=NZB; <0=C57). (B) Análisis de PCA de la varianza del quimerismo entre los tejidos de un mismo animal. En negro se representan los animales neonatos y en rojo los adultos. (C) Análisis de PCA de la varianza de cada tejido en animales adultos.

Es llamativa la variabilidad de quimerismo entre los diferentes tejidos de un mismo ratón, y como esta variabilidad aumenta con la edad del animal. En los ratones neonatos existe una gran homogeneidad en los niveles de quimerismo mitocondrial entre los tejidos de un mismo individuo. Sin embargo, en los animales de 60 a 100 días de edad, aumenta la heterogeneidad quimérica entre los tejidos del mismo individuo (*Figura III.13B*). Un análisis de componentes principales (PCA) de la varianza del quimerismo entre los tejidos de un animal, revela diferencias significativas entre neonatos y adultos. El aumento de la varianza del quimerismo en animales adultos es debido principalmente a cuatro tejidos: hígado, páncreas, duodeno y tejido adiposo marrón. Una explicación a este fenómeno es que estos tejidos sufren una gran proliferación celular post-natal, que facilita la selección aleatoria de células o clones celulares con una determinada variante de mtDNA.

Como no se ha encontrado ningún patrón direccional y selectivo en los animales quiméricos, concluimos que la heteroplasmia es un requisito necesario para que tenga lugar la segregación selectiva del mtDNA observada en los ratones heteroplásmicos.

IIIA.4 Discusión 3

Las mutaciones patológicas del mtDNA en humanos pueden segregar de una manera tejido-específica, afectando al comienzo y la severidad de la enfermedad. Los ratones heteroplásmicos generados en 1996 por el grupo del Dr. Shoubridge supusieron un modelo animal de gran utilidad para el estudio de la segregación selectiva del mtDNA. Los resultados publicados han sido reproducidos fielmente en nuestro laboratorio con ratones de origen distinto:

“Sin excepción, en todos los animales heteroplásmicos analizados, hay una segregación selectiva del mtDNA que responde a una dirección de selección específica de tejido e independiente de los niveles de heteroplasmia iniciales.”

En el debate original sobre la segregación selectiva del mtDNA se defendía que, como, no habían sido encontradas diferencias funcionales promovidas por las variantes de mtDNA, debían existir factores nucleares específicos de tejido que interaccionasen directamente con el mtDNA determinando la segregación (Battersby and Shoubridge, 2001; Battersby et al., 2003). Hasta la fecha, el único factor nuclear identificado involucrado en la segregación selectiva del mtDNA es Gimap3 (Jokinen and Battersby, 2013), y se trata de una GTPasa localizada en la membrana de retículo endoplásmico, que nunca se ha descrito que interaccione directamente con el mtDNA.

Con este trabajo hemos demostrado que las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB promueven diferencias funcionales *in vivo*, y que la segregación está causada por las diferencias funcionales de la mETC, tal y como indican las alteraciones en el ritmo de la segregación inducidas por DCA o NAC. Si bien es cierto que una demostración definitiva requiere el desarrollo de animales con alteraciones específicas en la mETC. Por ejemplo, nuestro grupo ha caracterizado la primera proteína mitocondrial responsable de la formación de supercomplejos, SCAFI (Lapiente-Brun et al., 2013), y tanto los ratones C57BL/6 como los ratones Balb/c tienen una delección en el gen de SCAFI que impide la asociación del CIII con el CIV originando importantes consecuencias en la función de la mETC. El análisis del comportamiento de segregación en ratones BL/6^{C57-NZB} SCAFI^{+/+}, pueden aportar información acerca de las implicaciones exclusivas de la función de la mETC en la segregación selectiva del mtDNA.

Hemos visto que las modificaciones en el metabolismo energético y en los niveles de ROS celulares promueven diferencias específicas de tejido en la segregación selectiva del mtDNA, sugiriendo que los mecanismos que gobiernan la segregación son también específicos de tejido. Esta idea se consolida con la identificación de la proteína Gimap3 y su papel en la regulación de la segregación del mtDNA exclusivamente en tejidos hematopoyéticos (Jokinen et al., 2010). Para entender los mecanismos de segregación tejido específicos es crítico contestar la siguiente pregunta: ¿Es la selección de un mtDNA debida a que se favorece su “proliferación” o es consecuencia de la eliminación del otro mtDNA? En la gráfica C de la figura III.4 se revela un aspecto muy interesante, en los tejidos hematopoyéticos la intensidad de selección es inversamente proporcional a la proporción del mtDNA seleccionado (C57BL/6), es decir, a mayor proporción del mtDNA C57BL/6, menor es la intensidad de su selección, y de hecho nunca se llega a eliminar el mtDNA NZB. Sin embargo, en los tejidos como hígado y riñón, la intensidad de segregación es directamente proporcional a la cantidad del mtDNA seleccionado (NZB) y se llega a eliminar completamente el mtDNA C57BL/6. Lo cual podría indicar que en el caso de tejidos hematopoyéticos la selección es negativa (se favorece la eliminación del mtDNA NZB), y en el caso de hígado y riñón, la selección es positiva (se favorece la acumulación del mtDNA NZB).

Quizás, lo que más sorprenda de la segregación selectiva del mtDNA, no es tanto la selección de un mtDNA en sí, sino la extrema y fiel reproducibilidad tanto en la dirección de segregación como en su intensidad, lo que indica que se trata de un mecanismo celular preservado y difícilmente alterable. *In vivo* hemos visto que el estatus metabólico celular puede definir la intensidad de selección, pero no la dirección, poniendo de manifiesto que el metabolismo y la condición propia del tipo celular tienen un papel preponderante en la segregación del mtDNA. Por ello, sería de gran interés estudiar la segregación del mtDNA *in vitro* durante la diferenciación celular a diferentes tipos celulares.

Un resultado muy interesante y susceptible de estudio, es el efecto del NAC en la segregación en los tejidos hematopoyéticos, que sugiere un papel relevante de los ROS en la segregación del mtDNA en este tipo celular. Como la administración de NAC aminora la acumulación del mtDNA C57BL/6 en los tejidos hematopoyéticos, e incluso llega a detener la selección en el timo, es fácil especular que la posible producción de ROS diferencial entre las variantes de mtDNA, en las células progenitoras, pueda tener un impacto en el mantenimiento y destino celular (Arranz et al., 2013) o bien en el mantenimiento de la mitocondria. Así se podría explicar la acumulación del mtDNA C57BL/6 (menos rosgénico) en las células hematopoyéticas, y también, el del mtDNA *wild-type* en la sangre de pacientes con la mutación A3243G en heteroplasmia (Rahman et al., 2001). Además, esta observación conduce a asociar la segregación del mtDNA con las células madre pluripotentes adultas (ASCs), responsables del mantenimiento de la homeostasis y reparación celular en individuos adultos (García-Prat et al., 2013) ampliando el campo del estudio de la segregación del mtDNA en los nichos de ASCs.

Lamentablemente, no tenemos suficientes elementos para concretar si la selección ocurre a nivel de orgánulo, a nivel celular o si contribuyen ambos. Los datos obtenidos en esta tesis no son, a nuestro entender, suficientes para descartar o aceptar (i) las posibles implicaciones de la dinámica mitocondrial en la segregación del mtDNA; ni (ii) el papel de la competición celular en la selección:

- (i) Se ha descrito que hay una estrecha relación entre la arquitectura y dinámica mitocondrial con el aporte de nutrientes y la función bioenergética (Dietrich et al., 2013; Liesa and Shirihai, 2013; Quirós et al., 2012), sin embargo con una dieta alta en grasa, tan sólo el duodeno y tejido adiposo blanco presentaban cambios en la segregación del mtDNA; de manera que, si la dinámica mitocondrial fuese crítica en el mecanismo de segregación selectiva, se esperaría encontrar cambios, aunque fueran leves, en la intensidad de segregación con dieta grasa en mayor número de tejidos. Por otro lado, la pérdida de la proteasa OMA1, y por tanto, la pérdida de los mecanismos inducidos por estrés mitocondrial que de ella dependen, no altera la segregación selectiva del mtDNA.
- (ii) Los análisis de las quimeras mitocondriales ponen de manifiesto que la heteroplasmia celular es necesaria para que tenga lugar la segregación selectiva del mtDNA. pero no podemos descartar que el fenómeno de competición celular juegue un papel en la segregación del mtDNA.

Por último, retomemos el concepto del *mismatch nDNA/mtDNA*. Hasta ahora tan sólo se han tenido en cuenta las diferencias del *mismatch* generado por el nDNA con el mtDNA C57BL/6 o

con el mtDNA NZB; pero en una condición heteroplásmica se puede generar un nuevo *mismatch* como resultado de la interacción de tres genomas: el nDNA y los dos mtDNAs. Por ello concluimos, que para entender el fenómeno de heteroplasmia y todas las implicaciones que de ella dependen, se hace necesario diseñar y desarrollar procedimientos experimentales que nos permitan elucidar si es posible la formación de una nueva cadena respiratoria mitocondrial, con proteínas procedentes de los dos genomas mitocondriales.

III.B Estudio de la segregación del mtDNA en la transmisión intergeneracional

Entender la evolución de la heteroplasmia en la línea germinal femenina tiene implicaciones muy importantes dado que el mtDNA se transmite únicamente por vía materna. Pero además, existen motivos relevantes de índole biomédico. Actualmente no existe cura para las enfermedades causadas por mutaciones en el mtDNA, tan sólo hay tratamientos paliativos para aliviar los síntomas y retrasar la progresión de la enfermedad. En los últimos años se lleva realizando un gran esfuerzo en la prevención de la transmisión del mtDNA mutante de la madre a la descendencia, mediante el diagnóstico genético pre-natal o preimplantacional, o mediante la polémica técnica de la transferencia nuclear a un citoplasma con mtDNA sano (Craven et al., 2010). En pedigríes humanos y en modelos murinos, se ha visto que existe una selección purificadora en la línea germinal femenina en contra de las mutaciones patológicas del mtDNA (Fan et al., 2008; Stewart et al., 2008a). Por ello, entender los principios que gobiernan la transmisión de las variantes de mtDNA tiene una importancia fundamental para los pacientes con enfermedades mitocondriales.

IIIB.1 Transmisión intergeneracional de la heteroplasmia

IIIB.1.1 Heteroplasmia en las crías

Durante más de tres años de cruces, se registró la heteroplasmia al destete en cola de 707 crías procedentes de 41 hembras cuyos niveles de heteroplasmia (también en cola) estaban comprendidos entre el 17 y el 82%.

En contradicción con los resultados publicados por el grupo del Dr. Shoubridge (Jenuth et al., 1996), pero de acuerdo con los publicados más recientemente por el del Dr. Wallace (Sharpley et al., 2012), la proporción del mtDNA NZB en cola de la progenie era significativamente menor que la proporción en la madre. Existe un fuerte sesgo que favorece la progresión hacia la homoplasmia del mtDNA C57BL/6 en la transmisión intergeneracional, que es independiente de los niveles de heteroplasmia de la madre, pero fuertemente dependiente de la edad de la misma (*Figura III.14*).

Una observación a destacar es que en más de tres años de cruces dirigidos, eligiendo como reproductoras aquellas hembras con mayor porcentaje de mtDNA NZB en cola, nunca se ha obtenido una cría homoplásmica para este mtDNA. Por el contrario, en tan sólo una generación aparecen crías homoplásmicas para el mtDNA C57BL/6, independientemente de la heteroplasmia materna. Es también destacable la gran variabilidad presente en los niveles de heteroplasmia entre las crías de una misma camada.

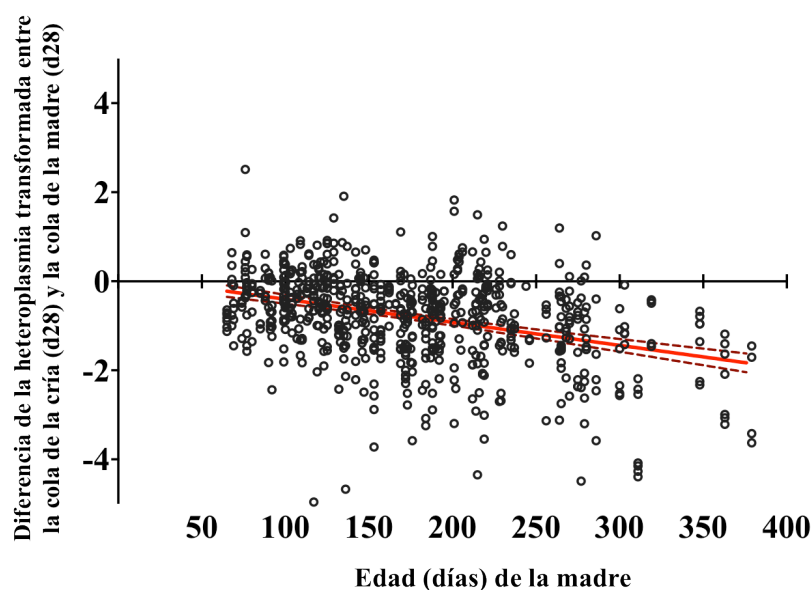


Figura III.14: Enriquecimiento del mtDNA C57BL/6 en la progenie de las hembras heteroplásmicas. Representación de la heteroplasmia transformada de la cola de las crías d28 ($n=707$) respecto a la heteroplasmia en cola de la madre d28 ($n=41$), en función de la edad de la hembra reproductora en el momento del parto. La línea roja representa la regresión lineal de la evolución de la heteroplasmia de las crías en función de la edad de la hembra ($p<0.0001$, F test, pendiente diferente a 0).

IIIB.1.2 Heteroplasmia en la línea germinal femenina

Para investigar si el sesgo a favor del mtDNA C57BL/6 observado en la progenie de las hembras heteroplásmicas tiene lugar en la línea germinal femenina, se cuantificó la heteroplasmia en el ovario e un total de 58 hembras con edades comprendidas entre 39 y 349 días, y que presentaban una heteroplasmia en cola del 10 al 86% (proporción del mtDNA NZB).

Los ovarios presentaban una fuerte selección del mtDNA C57BL/6 muy dependiente de la edad de la hembra (*Figura III.15 A*). Si calculamos la proporción de la diferencia de la heteroplasmia transformada frente a la edad de la hembra, podemos ver que la intensidad de selección es constante a partir de los 100 días de edad de la hembra, y que se produce una fuerte selección durante los dos primeros meses de vida (post-natal) (*Figura III.15 B*). Por último si se compara la heteroplasmia transformada de las hembras de más de 100 días de edad (cuando la intensidad de segregación es constante), respecto a los niveles de heteroplasmia en cola, se observa que la intensidad de selección es inversamente proporcional a la proporción del mtDNA C57BL/6 en cola (*Figura III.15 C*).

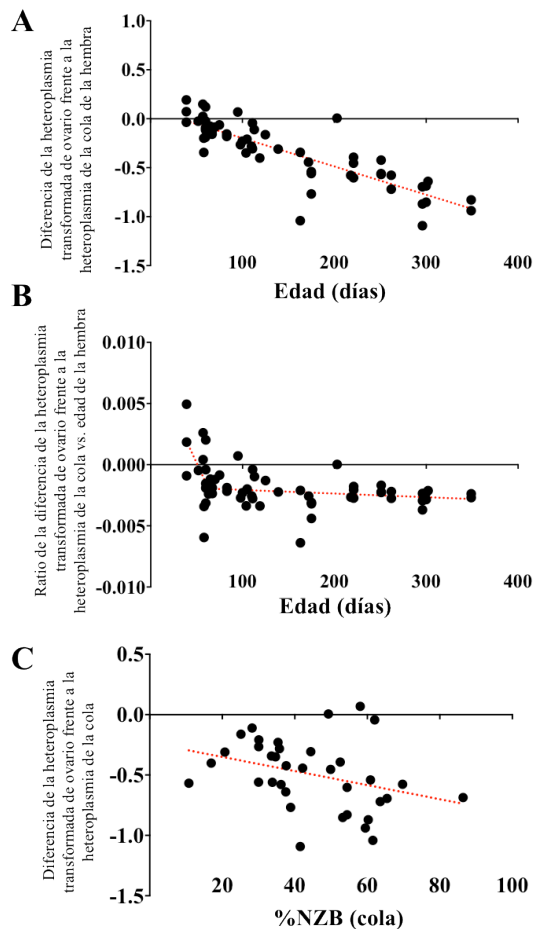


Figura III.15: Descripción de la evolución de la heteroplasma en ovario.

(A) Representación de la diferencia de la heteroplasma transformada del ovario frente a la cola (ordenadas) frente a la edad de la hembra (abscisas). ($n=58$, $p<0,0001$, F-test). (B) Representación de la ratio de la heteroplasma transformada del ovario frente a la cola vs. la edad de la hembra (ordenadas) frente a la edad de la hembra (abscisas). (C) Representación de la heteroplasma transformada del ovario frente a la cola (ordenadas) frente a la heteroplasma en cola (abscisas) de 36 hembras de 100 a 346 días de edad. ($p=0,0468$, F-test).

En conclusión, a lo largo de la vida reproductora de la hembra, los ovarios presentan un incremento del mtDNA C57BL/6 que correlaciona con el sesgo observado en la descendencia (Figura III.16).

Para determinar si el incremento en la proporción del mtDNA C57BL/6 observado en el tejido ovárico correlacionaba con la heteroplasma en ovocitos maduros, cuantificamos los niveles de heteroplasma en 106 ovocitos maduros provenientes de 12 hembras con edades comprendidas entre 52 y 296 días (Figura III.16). Con estos resultados se puso de manifiesto que:

- (i) Existe una alta variabilidad en los niveles de heteroplasma entre los ovocitos provenientes del mismo ovario, lo cual explicaría la variabilidad encontrada también entre las crías de una misma camada. Hay numerosas referencias en la literatura que concuerdan con esta observación (Hauswirth and Laipis, 1982; Larsson et al., 1992). Se ha sugerido que la existencia de un cuello de botella del mtDNA en la línea germinal femenina es la responsable del rápido cambio hacia situaciones de homoplasma en tan sólo una generación.

- (ii) El promedio de la heteroplasma de los ovocitos correlaciona con la heteroplasma del tejido ovárico de la misma hembra. Además, la evolución de la heteroplasma de los ovocitos durante la vida reproductiva de la hembra coincide con el sesgo a favor del mtDNA C57BL/6 observado en el ovario.

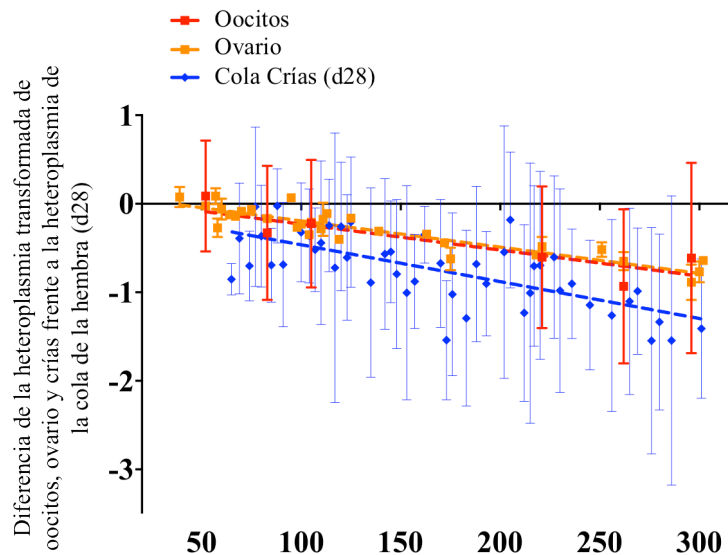


Figura III.16: Enriquecimiento del mtDNA C57BL/6 en ovocitos, ovario y crías. Representación de la heteroplasma transformada de ovocitos, ovario y crías de una misma camada frente a la heteroplasma en cola de la reproductora en función de la edad de la misma. La línea discontinua representa la regresión lineal de la evolución de la heteroplasma en función de la edad de la hembra: pendiente diferente a 0 en los tres casos ($p < 0.0001$, F test); no hay diferencias en el valor de la pendiente de las líneas de regresión (F test), sin embargo, la elevación (y-intercepto) difiere entre las crías frente a ovocitos y ovario ($p = 0.0001$, F test).

IIIB.1.3 Heteroplasma durante el desarrollo embrionario

Solamente con los niveles de heteroplasma de la línea germinal femenina, no podemos explicar la totalidad del sesgo del mtDNA C57BL/6 en la descendencia de hembras heteroplásmicas.

Si bien es cierto que el incremento en la proporción del mtDNA C57BL/6 a lo largo de la vida reproductiva de la hembra es similar entre la línea germinal y la descendencia; la intensidad de selección es superior en la descendencia en todo momento (*Figura III.16*).

En primer lugar, nos propusimos esclarecer si la discrepancia en la intensidad de selección entre línea germinal y descendencia es relevante, para a continuación evaluar si, además de en la

línea germinal femenina, existen otros niveles de selección del mtDNA en la transmisión intergeneracional. Para ello evaluamos si había un sesgo en la heteroplasma en ovocitos maduros y embriones de 2.5, 6.5 y 13.5 días con respecto al ovario de la hembra (*Figura III.17*).

El promedio de la heteroplasma de ovocitos y embriones de 2.5 días correspondía con los niveles de heteroplasma del ovario de la hembra. Sugiriendo que la fecundidad temprana no se ve influida por los niveles de heteroplasma del ovocito o cigoto.

Sin embargo, en los embriones de 6.5 días se había producido un sesgo significativo a favor del mtDNA C57BL/6 que se consolidaba a los 13.5 días y coincidía con el observado en la descendencia.

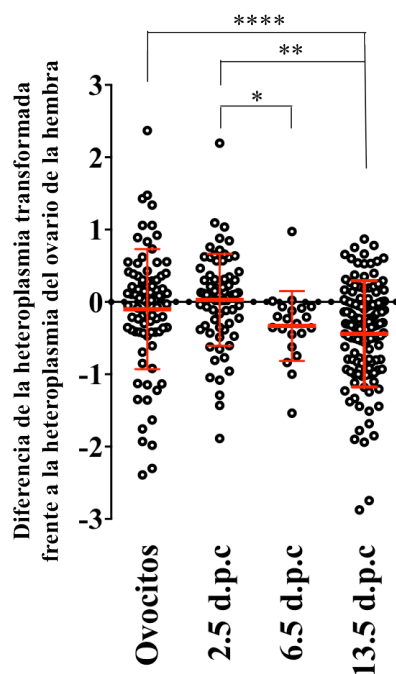


Figura III.17: Enriquecimiento del mtDNA C57BL/6 durante el desarrollo embrionario. Representación de la heteroplasma transformada frente al ovario de la reproductora de: ovocitos (n=84), embriones de 2.5 días (n=71), 6.5 días (n=21) y 13.5 días (n=135). (*p<0.05 t-test).

Estos resultados sugieren la existencia de una selección del mtDNA C57BL/6 durante la transmisión intergeneracional del mtDNA en la línea germinal femenina y en las primeras etapas del desarrollo embrionario.

Se evaluaron los datos de fertilidad de las hembras BL/6^{C57}, BL/6^{NZB} y BL/6^{C57-NZB} con diferentes niveles de heteroplasma, no encontrándose diferencias en los índices de fertilidad. Por tanto, la selección del mtDNA C57BL/6 en las camadas de las hembras heteroplásmicas no se explica por una mortalidad específica de embriones con mayor contenido de mtDNA NZB. El promedio de crías por camada en los tres primeros partos de una hembra reproductora era de 6-6,5 en las tres estirpes de ratón. Tampoco en la necropsia de los embriones encontramos indicios de un incremento en la presencia de reabsorciones embrionarias en el útero de las hembras heteroplásmicas.

Se analizó también la heteroplasma de los principales tejidos fetales en embriones de 17,5 días (corazón, hígado, bazo, riñón, intestino, cerebro, pulmón, páncreas, tejido adiposo marrón y cola) y de 13,5 días (placenta, hígado y piel). Los órganos provenientes del mismo embrión presentaban niveles comparables de heteroplasma (*Figura III.18.*). Este resultado sugiere que la selección del mtDNA C57BL/6 durante el desarrollo embrionario, tiene lugar antes de la especificación celular.

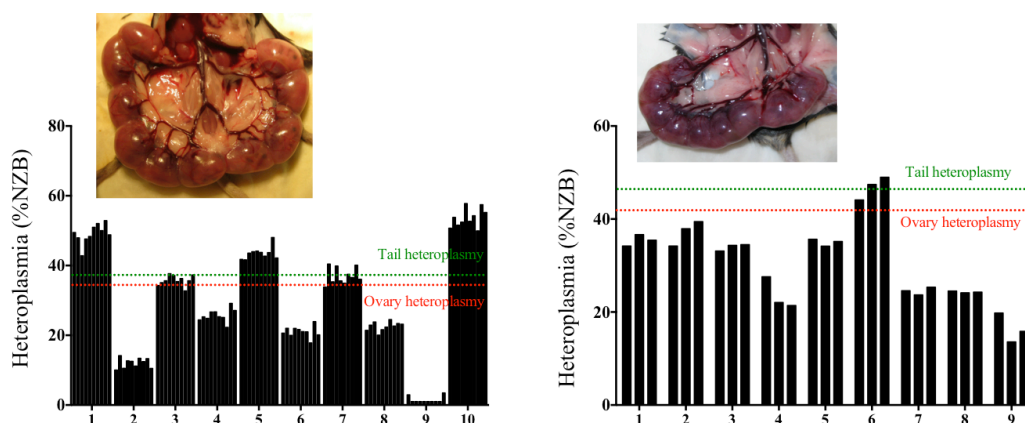


Figura III.18: Heteroplasma en los tejidos fetales. Representación de la heteroplasma (%NZB) de los diferentes tejidos fetales de un mismo embrión. (Izquierda) 10 embriones de una camada de 17.5 días, se representa por embrión la heteroplasma en: corazón, hígado, bazo, riñón, intestino, cerebro, pulmón, páncreas, tejido adiposo marrón y cola. (Derecha) 9 embriones de una camada de 13.5 días, se representa por embrión la heteroplasma en: placenta, hígado y piel.

IIIB.2 Segregación del mtDNA y pluripotencia

Hay una coincidencia temporal entre la selección del mtDNA C57BL/6 durante el desarrollo embrionario y la pérdida de pluripotencia de las células que componen el embrión. Para comprobar si esta correlación puede ser relevante, se estudió si el estado de diferenciación celular puede afectar la segregación del mtDNA. Para ello utilizamos como modelo de estudio células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas de MEFs de los ratones BL/6^{C57}, BL/6^{NZB} y BL/6^{C57-NZB}.

IIIB.2.1 Segregación del mtDNA durante la reprogramación de MEFs heteroplásicos a iPSCs

La generación de iPSCs se realizó a partir de MEFs en pasaje 1-2 mediante la transfección de los factores de reprogramación (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) con el sistema inducible por doxiciclina PiggyBac Transposón (ver material y métodos) (Woltjen et al., 2011).

Para este experimento se utilizaron cinco líneas de MEFs procedentes de cinco embriones heteroplásmicos de diferentes camadas, con porcentajes de heteroplasma en piel comprendidos entre el 30 y 55% de mtDNA NZB. Se midió la heteroplasma (i) en el cultivo global en pasaje 1-2, (ii) en clones procedentes de una sola célula de MEFs, y (iii) en las colonias de iPSCs tras la reprogramación.

Tal y como vimos en el apartado III.A, la variabilidad en la heteroplasma de las células provenientes del mismo embrión era bastante considerable, aunque el promedio de la heteroplasma de todos los clones analizados correspondía con la heteroplasma global del cultivo (*Figura III.19*).

Por el contrario, la distribución de la heteroplasma de las colonias de iPSCs analizadas tras la reprogramación de los MEFs, era significativamente distinta a la de partida. En los cinco casos se manifestó un sesgo a favor del mtDNA C57BL/6. Sugiriendo que durante la reprogramación a iPSCs de cultivos de fibroblastos heteroplásmicos se produce una selección del mtDNA C57BL/6 (*Figura III.19*).

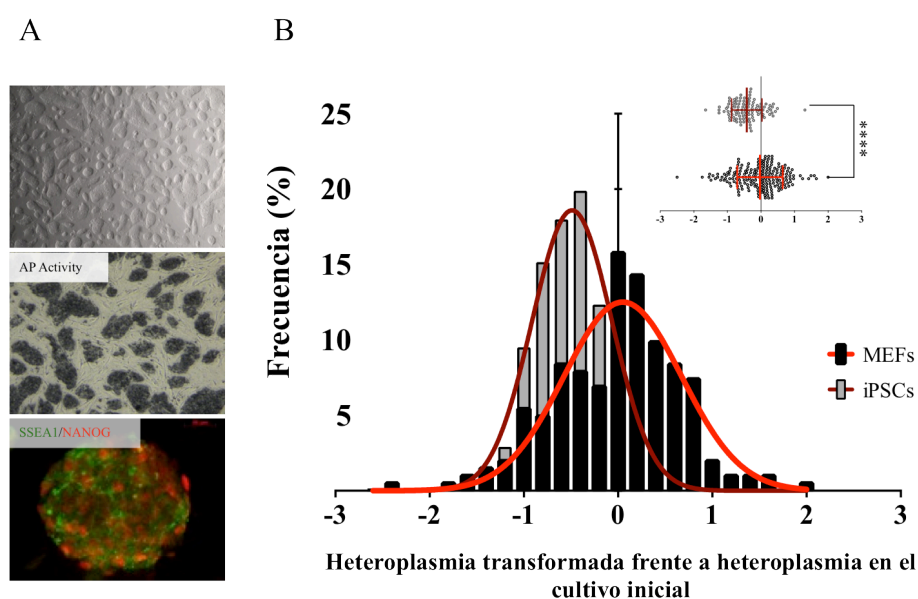


Figura III.19: Enriquecimiento del mtDNA C57BL/6 en la reprogramación a iPSCs de MEFs heteroplásmicos. (A) Caracterización de iPSCs, de arriba abajo: morfología, actividad de la fosfato alcalina e inmunofluorescencia (anti-SSEA1 y nanog). (B) Histograma de la frecuencia relativa (%) de la heteroplasma transformada frente a la heteroplasma global del cultivo de MEFs, de: células individuales de MEFs (negro) y colonias de iPSCs obtenidas tras la reprogramación de los mismos (gris). Se han representado conjuntamente los datos obtenidos de cinco experimentos realizados con cinco líneas diferentes de MEFs (clones de MEFs, $n=203$; colonias de iPSC, $n=106$). En la esquina derecha superior se muestra la representación de cada medida individual con la media y desviación estándar del conjunto. (**** $p<0.0001$, t-test)

IIIB.2.2 Eficiencia de reprogramación a iPSCs de MEFs BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}

En el experimento anterior llama la atención que la curva gaussiana de la distribución de la heteroplasma en las colonias de iPSCs ($R=0,9551$) está contenida en su totalidad dentro de la curva gaussiana de la distribución de la heteroplasma de los MEFs ($R=0,889$) (Figura III.19). Una posible explicación a este fenómeno es una mayor eficiencia de reprogramación de las células con mayor contenido de mtDNA C57BL/6.

Para evaluar si hay diferencias en la eficiencia de reprogramación a iPSCs de MEFs con distintos niveles de heteroplasma hicimos uso de los animales conplásticos. Establecimos diferentes líneas de MEFs homoplásmicos, provenientes de BL/6^{C57} ($n=10$, de 5 camadas diferentes) y BL/6^{NZB} ($n=9$, de 4 camadas diferentes).

Estimamos la eficiencia de reprogramación mediante la cuantificación del número de colonias de iPSCs obtenidas en cada caso después de transfectar el mismo número de células bajo las mismas condiciones. La eficiencia de reprogramación era significativamente mayor en las células con el mtDNA C57BL/6, y la eficiencia en los MEFs heteroplásmicos era significativamente menor que en BL/6^{C57}, pero mayor que en BL/6^{NZB} (Figura III.20).

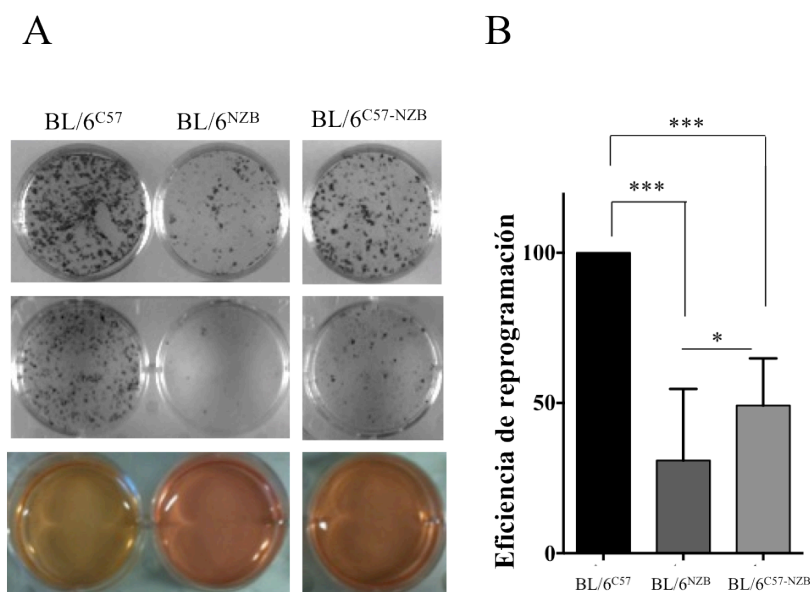


Figura IIIB.20: Eficiencia de reprogramación. (A) Imágenes representativas de la tinción de la fosfatasa alcalina (AP) siete días después de la transfección y de la acidez del medio. (B) Eficiencia de reprogramación relativa tras la cuantificación de la tinción AP, en BL/6^{C57} ($n=10$), BL/6^{NZB} ($n=9$) y BL/6^{C57-NZB} ($n=5$). Cada experimento se ha normalizado con respecto a BL/6^{C57}. (* $p<0,05$, t-test)

Podemos concluir que la eficiencia de reprogramación a iPSCs, de MEFs provenientes de embriones de 13,5 días con el método utilizado, está significativamente influenciada por la

variante de mtDNA. Con este experimento ponemos de manifiesto que el mtDNA, y por tanto la función mitocondrial juega un papel fundamental en la reprogramación celular *in vitro*.

IIIB.2.3 Segregación del mtDNA en iPSCs heteroplásmicas

En fibroblastos heteroplásmicos immortalizados vimos que, tras 60 días de cultivo y un medio con 25mM glucosa, los niveles de heteroplasmia se mantenían constantes. Así, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la selección del mtDNA en células pluripotentes (iPSCs).

Establecimos 8 líneas de iPSCs heteroplásmicas, provenientes de colonias individuales de cinco experimentos de transfección distintos. Se mantuvieron las iPSCs en cultivo (con medio ES, *ver material y métodos*) durante 20 días y se sometieron a un total de 10 pasajes. En las 8 líneas de iPSCs se produjo un enriquecimiento progresivo del mtDNA C57BL/6 a lo largo del cultivo (*Figura IIIB.21 A*)

Esta selección del mtDNA C57BL/6 en células heteroplásmicas pluripotentes, correlacionaba con una mayor tasa de proliferación de las iPSCs homoplásmicas para el mtDNA C57BL/6. Establecimos 4 líneas de iPSCs procedentes de la reprogramación de MEFs BL/6^{C57} y BL/6^{NZB} respectivamente. Y, aunque no encontramos diferencias significativas en la expresión de marcadores de pluripotencia entre ambas líneas celulares (expresión de OCT4, REX, Nanog, Dnmt3b y Sox2), el crecimiento celular era sensiblemente diferente (*Figura IIIB. 21 B*).

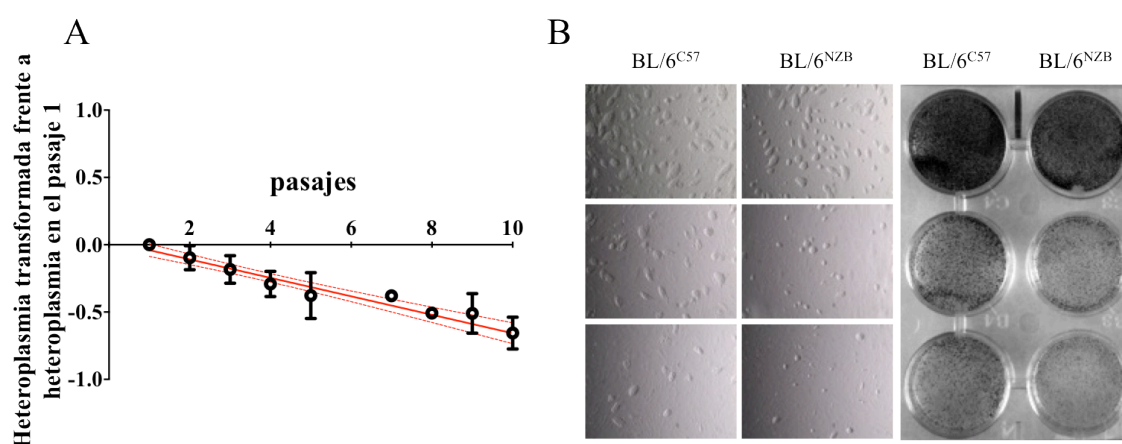


Figura IIIB.21: Segregación del mtDNA en iPSCs. (A) Heteroplasmia transformada respecto a los niveles en el pasaje 1, de 8 líneas de iPSCs heteroplásmicas durante 20 días de cultivo. ($p < 0,0001$, F-test, pendiente diferente a cero). (B) Tamaño de colonias (objetivo 10X) y tinción AP en iPSCs homoplásmicas (BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}) dos días después de sembrar 50.000, 10.000 y 5.000 células respectivamente.

IIIB.2.4 Segregación del mtDNA, reprogramación celular e influencia de la concentración de oxígeno y la producción de ROS

Muchos estudios han mostrado que hay una fuerte conexión entre la función mitocondrial y la pluripotencia (Xu et al., 2013). En la reprogramación de células somáticas a iPSCs y en el mantenimiento de ESc se ha descrito que tanto la tensión de oxígeno (Szablowska-Gadomska et al., 2011) como los niveles de ROS (Berniakovich et al., 2012) juegan un papel fundamental. También se ha descrito *in vivo* que la tensión de oxígeno (hipoxia) y los niveles de ROS mantienen estados indiferenciados en células madre embrionarias, hematopoyéticas (Ito et al., 2004; Tai-Nagara et al., 2014), mesenquimales y neurales (Chuikov et al., 2010), y también influye en la proliferación y destino celular (Chaudhari et al., 2012).

Por ello, el siguiente experimento que realizamos *in vitro* fue reprogramar los MEFs con las diferentes combinaciones de mtDNA (homoplásmicos: BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}, y heteroplásmicos: BL/6^{C57-NZB}), (i) con bajas tensiones de oxígeno (21% vs. 4%); y, (ii) en presencia de NAC (1mM). Y se evaluó la eficiencia de reprogramación individual, y la segregación del mtDNA tras la reprogramación celular (*Figura IIIB.22*).

2.4.1 Reprogramación celular a iPSCs y tensión de oxígeno

Se reprogramaron 4 líneas de MEFs de cada genotipo en las mismas condiciones con tensiones de oxígeno del 21% y 4% respectivamente. Bajo tensiones del 4% de oxígeno, la eficiencia de reprogramación mejoraba significativamente en las tres líneas celulares.

Debido probablemente a que el incremento en la eficiencia de reprogramación era proporcional en MEFs BL/6^{C57} y BL/6^{NZB}, no encontramos cambios en la heteroplasmia entre las colonias de iPSCs obtenidas al 21 y 4% de oxígeno. En ambas condiciones, observamos un enriquecimiento significativo del mtDNA C57BL/6.

2.4.1 Reprogramación celular a iPSCs y ROS

En este caso los experimentos de reprogramación se realizaron bajo condiciones del 21% de oxígeno y en presencia y ausencia de NAC (1mM). La presencia de NAC, no promovía diferencias en la eficiencia de reprogramación de las células BL/6^{C57}. Sin embargo, se mejoraba significativamente la eficiencia en las células BL/6^{NZB} y BL/6^{C57-NZB}.

Sorprendentemente, tras la reprogramación de MEFs heteroplásmicos en presencia de NAC, no se encontraron diferencias en el promedio de la heteroplasma entre las colonias de iPSCs obtenidas, y la heteroplasma en el cultivo inicial.

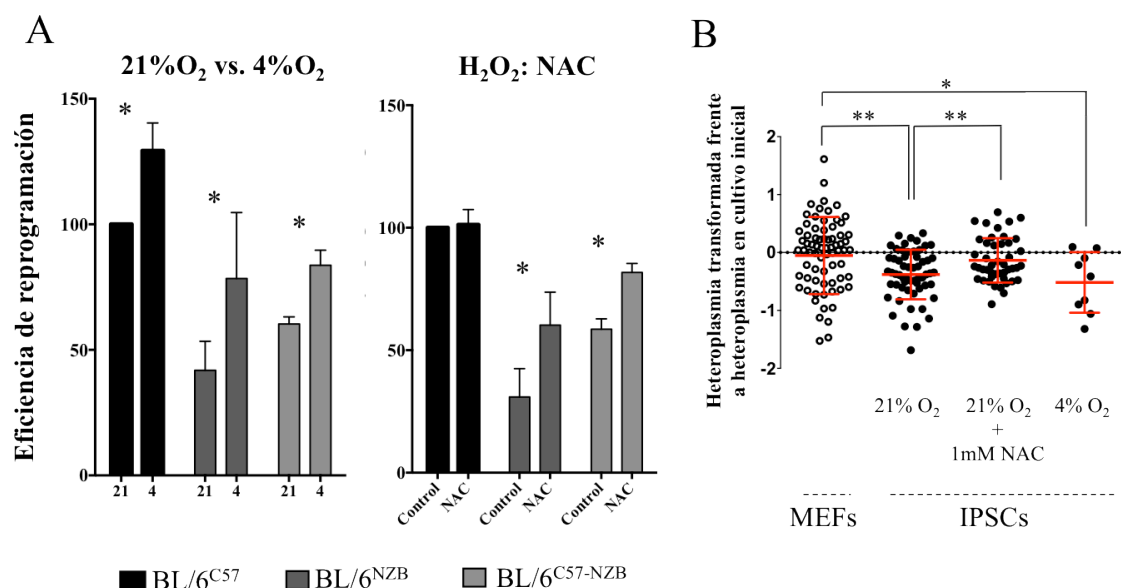


Figura IIB.22: Concentración de oxígeno y ROS en la segregación del mtDNA y la reprogramación a iPSCs. (A) Eficiencia de reprogramación relativa a iPSCs de MEFs BL/6^{C57}, BL/6^{NZB} y BL/6^{C57-NZB} (n=4). *Izquierda:* En condiciones del 21% y 4% de oxígeno (Normalizado frente a la eficiencia de BL/6^{C57} en 21% O₂). *Derecha:* En presencia y ausencia de NAC (1mM) en el medio (Normalizado frente a la eficiencia de BL/6^{C57} sin NAC). (B) Heteroplasma transformada frente a la heteroplasma del cultivo inicial de MEFs individuales (n=73) y de colonias de iPSCs obtenidas con el 21% de O₂ (n=58), 21% de O₂ + 1mM NAC (n=45), y 4% de O₂ (n=9). (*p<0,05, t-test).

En conjunto, estos resultados sugieren que el enriquecimiento del mtDNA C57BL/6 observado durante la reprogramación a iPSCs de células heteroplásmicas se deben muy probablemente a una ventaja de las células con mayor contenido del mtDNA C57BL/6.

IIB.3 Los ROS y la segregación del mtDNA durante el desarrollo embrionario

In vitro, hemos visto que las diferencias en la eficiencia de reprogramación entre células conteniendo las distintas variantes de mtDNA, eran compensadas mediante la adición de NAC en el medio, que específicamente incrementaba la eficiencia en las células con el mtDNA NZB.

Por ello, administramos NAC en agua de bebida a hembras reproductoras heteroplásmicas (n=5), y evaluamos la heteroplasma en cola de las crías obtenidas (n=51). De nuevo, observamos un enriquecimiento del mtDNA C57 en las crías con respecto a su madre. Pero la

intensidad de selección no era tan acusada como en las camadas de las hembras sin tratamiento (Figura IIIB.23).

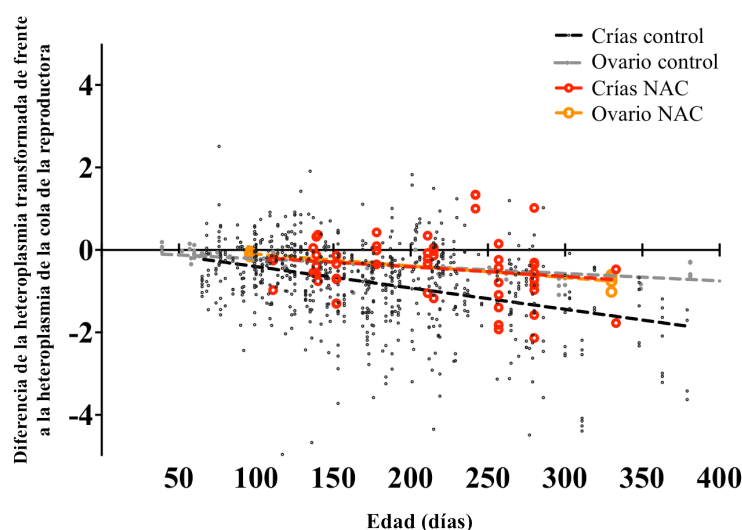


Figura IIIB.23: Comportamiento de segregación del mtDNA en la transmisión intergeneracional con NAC. Representación de la heteroplasma transformada de ovarios y crías frente a la heteroplasma en cola de la reproductora en función de la edad de la misma. En color (rojo y naranja) hembras reproductoras tratadas con NAC (1% en agua de bebida). La línea discontinua representa la regresión lineal de la evolución de la heteroplasma en función de la edad de la hembra: pendiente diferente a 0 en los cuatro casos ($p < 0,0001$, F test).

Para evaluar si la diferencia en la intensidad de selección se debía a un efecto del NAC sobre la línea germinal femenina, se determinó la heteroplasma en el ovario de 7 hembras de 100 y 300 días de edad, tratadas con NAC desde la edad reproductiva. La heteroplasma en ovario de estas hembras correspondía con la heteroplasma en el ovario de las hembras control.

En conclusión, la administración de NAC a reproductoras heteroplásmicas elimina la selección del mtDNA C57BL/6 que tiene lugar durante las primeras etapas del desarrollo embrionario.

IIIB.4 Implicaciones del *mismtach nDNA/mtDNA* en la segregación del mtDNA durante el desarrollo embrionario.

Aunque se desconocen aún los mecanismos moleculares responsables de la selección de un determinado mtDNA, nuestros resultados demuestran que son las diferencias funcionales asociadas a las variantes genéticas las responsables de esta selección.

En la transmisión intergeneracional del mtDNA hemos visto que, ya en la línea germinal femenina, se produce la ventaja selectiva del mtDNA C57BL/6. Pero la evaluación de las consecuencias funcionales del *mismatch* entre los genes codificados en el nDNA y los codificados en el mtDNA de un nuevo individuo tan sólo puede comenzar después de la fertilización, cuando ambos se enfrentan por vez primera: durante el desarrollo embrionario. En los experimentos realizados hasta ahora se ha utilizado un contexto nuclear sustancialmente homocigoto. El genoma nuclear derivado de nuevas fertilizaciones es casi idéntico al de la madre y no existe variabilidad generada por la mezcla de genes derivados de ambos progenitores. Para investigar la relevancia de esta particularidad, se cambiaron los machos reproductores C57BL/6 por machos NZB. De este modo los cruces fueron de hembras heteroplásmicas BL/6^{C57-NZB} (en las cuales conocemos el comportamiento de segregación del mtDNA en la línea germinal) con machos NZB, forzando así un contexto nuclear mucho mas complejo tras la fecundación (*Figura IIIB.24*).

Usando machos NZB como reproductores, no solamente se redujo la selección del mtDNA C57BL/6 durante el desarrollo embrionario, si no que además, en tan sólo una generación, se obtuvieron crías homoplásmicas para el mtDNA NZB.

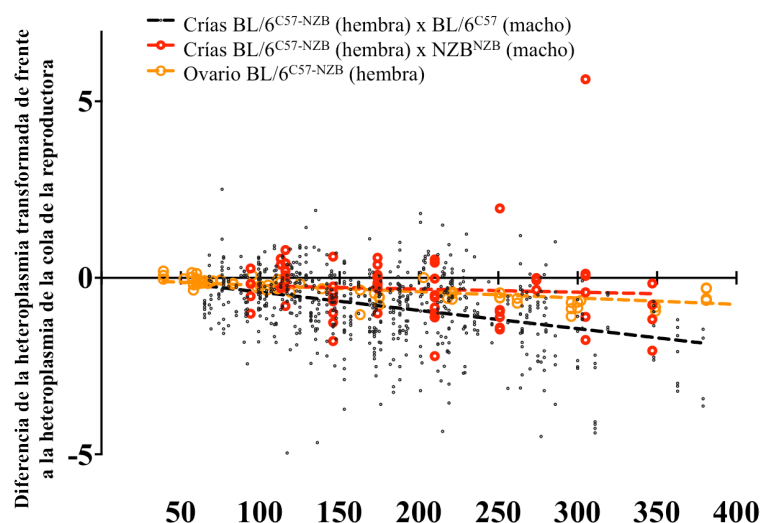


Figura IIIB.24: Selección del mismatch nDNA-mtDNA durante el desarrollo embrionario. Representación de la heteroplasma transformada de ovarios (naranja) y crías frente a la heteroplasma en cola de la reproductora BL/6^{C57-NZB} en función de la edad de la misma. En rojo se representa la heteroplasma de las crías obtenidas de cruces con machos NZB, y en negro con machos BL/6. La línea discontinua representa la regresión lineal de la evolución de la heteroplasma en función de la edad de la hembra: pendiente diferente a 0 en los tres casos ($p < 0.0001$, F test).

Es decir, el nuevo contexto nuclear formado tras la fecundación influye en la selección del mtDNA del individuo durante el desarrollo embrionario.

IIIB.5 Discusión 4

Una pregunta fundamental que sigue sin resolverse son los mecanismos de control en la transmisión intergeneracional del mtDNA que impiden la acumulación de defectos genéticos deletéreos a pesar de no sufrir recombinación. Muchos estudios apuntan hacia una selección en la eliminación de las células germinales vía apoptosis. De hecho, hace apenas unos meses se identificó la primera quinasa involucrada en el mantenimiento de la calidad y eliminación de ovocitos defectuosos mediante la activación de la apoptosis (Chu et al., 2014). Otro nivel de control propuesto ha sido durante las primeras etapas del desarrollo embrionario; al demostrar que en el epiblasto, es decir, el tejido embrionario que contiene las células madre pluripotentes que van a generar el embrión entero, existe una competición celular natural que contribuye a la selección de *pools* de células específicas (Clavería et al., 2013).

El caso de la transmisión intergeneracional del mtDNA es fascinante, pues aunque el mtDNA tiene una tasa de mutación 10 veces superior al nDNA, y, pese a que existen pocos mecanismos de reparación del mismo, la transmisión intergeneracional de mutaciones en el mtDNA es rara. De hecho, varios estudios en ratones han demostrado una selección purificadora frente a las mutaciones del mtDNA en la línea germinal femenina (Fan et al., 2008; Stewart et al., 2008b). Sin embargo, hay otros estudios que, con mutaciones en el mtDNA menos severas (en el tRNA^{Met}), ven también una fuerte selección purificadora en la descendencia, pero no la ven en la línea germinal femenina, lo que sugiere la presencia de mecanismos que actúen tras la fecundación (Freyer et al., 2012).

Otro hecho relevante que concierne al mtDNA es la presencia de un cuello de botella genético en la línea germinal para explicar la gran variabilidad en la heteroplasma encontrada en la descendencia durante la transmisión del mtDNA (Jacobs et al., 2007; Jenuth et al., 1996). No hay consenso acerca de cuándo y dónde este cuello de botella tiene lugar. Los dramáticos cambios en el número de copias de mtDNA entre las PGCs (alrededor de 200 copias) y el ovocito (alrededor de 100.000 copias) sugieren que el cuello de botella del mtDNA sea debido a una reducción en el número de copias de mtDNA. Atendiendo a esta hipótesis, se han descrito dos momentos en los cuales el cuello de botella pudiese tener relevancia: (i) durante la diferenciación de PGCs (200-1300 copias de mtDNA) a oogonias (2000-4000 copias de mtDNA) (Cree et al., 2008), o, (ii) de oogonias (2000 copias de mtDNA) a ovocito (100.000 copias de mtDNA) (Wai et al., 2008). Pero hay un trabajo reciente, realizado tras la generación de ovocitos de primates heteroplásmicos, que demuestra que la evolución hacia la homoplasma puede ocurrir durante el desarrollo embrionario del individuo, sin tener que pasar por la línea germinal; y el cuello de botella podría ya ocurrir en el epiblasto (Lee et al., 2012).

En conclusión, en la transmisión intergeneracional del mtDNA existen dos niveles de selección: (1) en la línea germinal femenina, y (2) durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Los ratones heteroplásmicos BL/6^{C57-NZB} supondrían el primer modelo en el cual se describen ambos fenómenos en el mismo individuo.

La selección del mtDNA C57BL/6 en la descendencia de los ratones heteroplásmicos ya ha sido descrita anteriormente, pero esta selección se atribuyó en exclusiva a la segregación que sufre este mtDNA en la línea germinal femenina (Sharpley et al., 2012). Pero más allá de las aproximaciones matemáticas realizadas en este capítulo que sugieren mecanismos de selección durante el desarrollo embrionario, el simple hecho de cruzar una hembra BL/6^{C57-NZB} con un macho NZB y obtener crías prácticamente homoplásmicas para el mtDNA NZB (nunca encontradas en cruces con machos C57BL/6, pese a elegir hembras con mas de un 80% de NZB) confirma que tras la fecundación existen otros mecanismos de selección.

Selección del mtDNA en la línea germinal femenina

El ovario de las hembras neonatas y prepúberes heteroplásmicas no presenta signos de selección del mtDNA. Sin embargo a partir aproximadamente del día 40 de edad tiene lugar una fuerte selección del mtDNA que poco a poco va disminuyendo de intensidad hasta llegar a un punto en que la intensidad de selección se mantiene constante a lo largo de la vida reproductiva de la hembra. Además, esta selección es inversamente proporcional a los niveles de heteroplasma iniciales. A falta de experimentos que lo confirmen, estos datos sugieren que durante la atresia folicular y la maduración de ovocitos hay una selección negativa del mtDNA NZB o positiva del mtDNA C57BL/6. Hay dos teorías descritas que pueden explicar esta selección. La primera de ellas sugiere que hay un aumento en el estrés oxidativo en aquellas oogonias con mayor cantidad del mtDNA mutante, y por tanto mayor predisposición a sufrir atresia folicular (selección intercelular) (Fan et al., 2008). La segunda teoría publicada hace sólo unos meses, describe que en Droshopila existe una propagación selectiva del mtDNA funcional durante la oogenesis restringiendo la transmisión de la variante deletérea (selección intracelular) (Hill et al., 2014).

Por otro lado, la variabilidad de la heteroplasma entre los ovocitos extraídos de hembras de 39 días de edad ya explica la variabilidad encontrada en la descendencia. Indicando que el cuello de botella genético mitocondrial tiene lugar muy probablemente en la etapa embrionaria (Freyer et al., 2012). Y que durante la atresia folicular ya existen oocitos con diferentes niveles de heteroplasma en un mismo ovario.

Estos modelos animales, conplásmicos y heteroplásmicos, pueden ser de gran utilidad para el estudio del papel del metabolismo en el mantenimiento de la homeostasis de la línea germinal

femenina y todas las implicaciones que de ella dependen (infertilidad, atresia folicular, actividad del las células progenitoras...) (Tilly and Sinclair, 2013). Así como también de la línea germinal masculina, dónde hemos observado también una selección del mtDNA C57BL/6 en las células espermáticas (datos no mostrados).

Selección del mtDNA en el desarrollo embrionario

Hemos demostrado, por primera vez, la existencia de una selección del mtDNA en las primeras etapas del desarrollo embrionario, y por tanto que compromete a la totalidad del individuo.

La biogénesis mitocondrial es mínima en las primeras etapas (pre-implantación) del desarrollo embrionario y el enorme caudal de mitocondrias del oocito (maternas) se reparte por dilución entre las células hijas en las primeras divisiones, generando células heterogéneas en cuanto a la distribución de las variantes de mtDNA se refiere (Lee et al., 2012). Por ello, proponemos que es a partir de la reactivación de la biogénesis mitocondrial (entorno a la implantación) cuando se evalúa el nuevo contexto nDNA-mtDNA. De nuevo, tanto los mecanismos intercelulares como intracelulares pueden ser los responsables de esta selección. Bien, porque exista una competencia celular entre células con distintos niveles de heteroplasmia y por tanto con diferente estatus metabólico (Clavería et al., 2013); o bien porque la reducción en el número de copias de mtDNA por célula facilite la propagación o la eliminación de un mtDNA.

Selección del mtDNA en iPSCs

Los experimentos realizados con iPSCs ponen de manifiesto que la variante de mtDNA presente puede aportar ventajas celulares tanto en el proceso de reprogramación como en el mantenimiento de las iPSCs. Esta ventaja se ve reflejada en la selección de este mtDNA en el cultivo de células heteroplásmicas pluripotentes.

Este resultado tiene una gran relevancia, en primer lugar porque mediante una aproximación diferente a las descritas anteriormente, volvemos a poner de manifiesto que las variantes de mtDNA C57BL/6 y NZB no son neutrales; en segundo lugar, probamos que la eficiencia de la reprogramación de células diferenciadas a iPSCs está altamente condicionada por la variante de mtDNA, y por tanto por la función mitocondrial, y, en tercer lugar, porque se revela que la condición celular y el estatus de diferenciación es crítico en la selección del mtDNA.

Por lo tanto la utilización de iPSC puede suponer una herramienta muy útil con la cual estudiar los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la segregación del mtDNA

durante el desarrollo y mantenimiento de células pluripotentes o bien durante la diferenciación celular (Folmes et al., 2013; Hämäläinen et al., 2013). Esta herramienta puede ayudar a explicar también aspectos tan enigmáticos de las enfermedades mitocondriales como porqué las mutaciones del mtDNA afectan diferentes tipos celulares causando diferentes fenotipos y cómo, dependiendo del tejido, la carga mutacional es determinante.

Esta descrito que los niveles de ROS son claves en el mantenimiento de la pluripotencia celular (Formentini et al., 2012), y una vez más, los efectos en la segregación tras la administración de NAC revelan un papel importante de los ROS en el mecanismo de selección en células pluripotentes. Además, la selección del mtDNA C57BL/6 durante el desarrollo embrionario se reduce si se administra NAC a las hembras gestantes, sugiriendo también que la señalización mediada por ROS es fundamental en la segregación del mtDNA durante este proceso.

Discusión

La mitocondria es el centro metabólico donde convergen importantes procesos catabólicos y anabólicos y donde se evalúa el correcto balance energético celular. La actividad de la mitocondria determina el balance de los sensores metabólicos celulares (ATP/ADP, NADH/NAD⁺, CoQH₂/CoQ y FADH₂/FAD), la concentración de metabolitos críticos en la señalización (AMP, α -cetoglutarato, succinato, citrato y acetil-CoA) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Todo ello, tiene un impacto significativo en los principales ejes de señalización moleculares de la célula: fosforilación, acetilación, oxido-reducción y degradación/estabilización de proteínas. En el centro de todos estos procesos se encuentra la cadena respiratoria mitocondrial (mETC) y el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).

La descripción de los componentes moleculares del sistema OXPHOS es extremadamente exhaustiva, sin embargo, ha resultado ser insuficiente para entender de forma global el sistema. Un buen ejemplo de ello son las enfermedades mitocondriales: somos incapaces de predecir el por qué, el cuándo y el cómo se manifestará una enfermedad si el sistema OXPHOS está dañado.

La complejidad organizativa y reguladora del sistema OXPHOS se manifiesta en los últimos trabajos publicados por nuestro grupo, en los que se describe una organización estructural y funcional dinámica de los complejos respiratorios, que forman distintas asociaciones entre sí atendiendo a la disponibilidad de los diferentes equivalentes de reducción (NADH o FADH₂) y que se explica bajo el modelo de plasticidad (Lapiente-Brun et al., 2013). Así mismo, se ha descrito una regulación mediada por ROS que implica al transporte reverso de electrones con la desestabilización de los complejos respiratorios para optimizar el uso de NADH/FADH₂ (Acín-Perez et al. *in press*) (Guarás et al. *in press*).

Todo ello hace de la mETC una estructura celular dinámica y versátil. En este trabajo nos hemos centrado en el doble origen genético de la mETC y las implicaciones de las variantes de mtDNA (no patológicas) en la funcionalidad de OXPHOS.

Hay una gran controversia acerca de la neutralidad o no de las variantes de mtDNA. Así, un número creciente de estudios proponen la asociación entre variantes específicas del mtDNA y determinados fenotipos, como el incremento de la severidad o penetrancia de enfermedades cuya causa genética primaria está en los genes nucleares (Johnson et al., 2001) o en el propio genoma mitocondrial (Brown et al., 2002); como factor determinante en la motilidad espermática (Ruiz-Pesini et al., 2000); en la predisposición a determinadas enfermedades metabólicas (Liou et al., 2012; Yang et al., 2011) o degenerativas (Hudson et al., 2013; Ridge et al., 2013), la susceptibilidad a drogas (Pacheu-Grau et al., 2010) y la longevidad (Catri et al., 2009; De Benedictis et al., 1999; Niemi et al., 2003; Nishigaki et al., 2010).

Diversos trabajos con animales conplásticos publicados previamente proponen de forma general que las variantes de mtDNA tienen efectos funcionales (Bär et al., 2013; Houštek et al., 2012; Kumarasamy et al., 2013; Roubertoux et al., 2003; Scheffler et al., 2012; Sethumadhavan et al., 2012). Sin embargo estos trabajos adolecen de deficiencias en la evaluación experimental del carácter conplásticos, los estudios están muy limitados en edades muy tempranas de los ratones y la evaluación experimental de las características fenotípicas es cuestionable en algunos casos; por ejemplo no se evalúa *in vivo* la producción de ROS sino *in vitro*. Además, no se propone un marco conceptual adecuado donde integrar estas y otras observaciones. Estas limitaciones han condicionado la aceptación de que las variantes mitocondriales tienen efectos funcionales basados en estos modelos. Nuestro trabajo elimina de forma sustancial las dudas experimentales, realiza un concienzudo y detallado estudio a lo largo de la vida de los animales y ofrece un nuevo marco conceptual: la hipótesis del “*mismatch intrínseco*”, que integra toda la información obtenida, las divergencias en los resultados según el órgano analizado y ofrece una visión integrada del fenómeno a nivel de organismo.

In vivo (en ratones) hemos reproducido tres de las grandes consecuencias fenotípicas asociadas con el mtDNA en humanos, enfrentando variantes de mtDNA sanas (consideradas neutrales, C57BL/6 y NZB) con el mismo fondo genético nuclear. Este trabajo aporta datos objetivos para explicar conceptual y molecularmente el papel de las variantes del mtDNA en la predisposición a padecer enfermedades degenerativas y metabólicas (i.e. resistencia a la insulina edad dependiente, degeneración asociada con el envejecimiento), en la susceptibilidad a drogas de uso clínico común (NAC y DCA) así como en el entendimiento de las asociaciones descritas de las variantes de mtDNA con la longevidad.

Hemos puesto de manifiesto tres características fundamentales de la mETC que son esenciales para entender las implicaciones funcionales de las variantes de mtDNA y que explican el porqué de la gran controversia encontrada en la literatura. En primer lugar, hemos demostrado que el resultado de la interacción entre las subunidades mitocondriales y nucleares es una característica intrínseca del sistema que promueve una funcionalidad variable dependiendo de los requerimientos del mismo. En segundo lugar, las diferencias a nivel funcional de la mETC desencadenan una adaptación celular global que se revela tanto en la expresión génica nuclear como en los niveles de metabolitos celulares. Y en tercer lugar, no se trata de un sistema estático, y sus propiedades y funcionalidad se verán afectadas específicamente en el proceso de envejecimiento dependiendo de las características intrínsecas iniciales y de los factores ambientales.

Durante años se ha considerado que la variabilidad no patológica en el mtDNA se ha acumulado en las poblaciones humanas bajo un modelo de equilibrio neutro, fuera de la selección, y con poca o ninguna relevancia como mediador de los procesos evolutivos poblacionales. Pero los cambios evolutivos del mtDNA coinciden con las mayores migraciones geográficas humanas, sugiriendo que la variabilidad del mtDNA ha permitido una adaptación de nuestros ancestros humanos a diferentes regiones ambientales (Galtier et al., 2009; Nabholz et al., 2008; Ruiz-Pesini et al., 2004). En este trabajo recogemos importantes indicios de esta presión selectiva sobre el mtDNA. La selección específica de tejido de las variantes sanas del mtDNA ya había sido descrita con anterioridad, pero los estudios de la transmisión intergeneracional del mtDNA proponen nuevos mecanismos genéticos de selección que tienen lugar ya durante las primeras fases del desarrollo embrionario, comprometiendo la transmisión del mtDNA en todo el individuo. Además, proponemos que la presión selectiva tiene lugar sobre el *mismatch* nDNA/mtDNA, que será testado tras la fecundación, siendo responsable de la estrecha coevolución que han sufrido ambos genomas a pesar de las enormes diferencias que presentan ambos en la ratio evolutiva.

Con estos resultados, proponemos que la complejidad de la genética y patofisiología de las enfermedades mitocondriales deben ser reinterpretadas desde el contexto del *mismatch* nDNA/mtDNA, lo que implica una aproximación terapéutica individualizada. Numerosas aproximaciones terapéuticas han sido diseñadas con el objetivo de mejorar la función de la cadena respiratoria (i.e suplementación con carnitina o CoQ₁₀) (Marriage et al., 2004), la eliminación de metabolitos nocivos (i.e administración de DCA para la eliminación de lactato) (Kaufmann et al., 2006; Miquel et al., 2012) o de radicales libres (i.e administración de antioxidantes) (Smith et al., 2008), o el aumento de la biogénesis mitocondrial (i.e administración de bezafibrato) (Wenz et al., 2008; Yatsuga and Suomalainen, 2012). Pero la gran disparidad en la respuesta a los diferentes tratamientos no hacen más que evidenciar la exclusividad genética del sistema, poniendo de manifiesto que deben diseñarse tratamientos individualizados. Un ejemplo claro de ello, es la administración de antioxidantes, que pueden ser beneficiosos en determinadas situaciones, inocuos en otras e incluso fatales en algunas (Bolisetty and Jaimes, 2013). La última aproximación terapéutica, en tramites de aprobación en el Reino Unido, es la transferencia mitocondrial embrionaria, popularmente conocida como “los hijos de tres padres genéticos” que consiste en la repoblación de ovocitos o cigotos con mtDNA sano procedente de una tercera persona (Craven et al., 2010). Con los resultados obtenidos en este trabajo recalamos la importancia de un control en la elección de la variante de mtDNA escogida para la repoblación.

Por último, es preciso destacar que durante esta tesis doctoral hemos desarrollado modelos animales, que sin modificaciones genéticas patológicas o sin la administración exógena de fármacos, nos permiten profundizar y entender el importante papel de la función OXPHOS en el

mantenimiento homeostático tanto celular como del organismo. Si bien es cierto que, debido a la transmisión uniparental del mtDNA, la heteroplasma de variantes sanas del mtDNA, al menos en los niveles presentados, no es un estado habitual en la naturaleza (Ramos et al., 2013), estos animales suponen un modelo excepcional de heterogeneidad funcional intra e intercelular que puede ser clave para el entendimiento de las comunicaciones y sistemas de regulación celulares.

Conclusiones

1. Las variantes no patológicas de mtDNA murinas C57BL/6 y NZB inducen diferencias en la capacidad OXPHOS, diferencias en la producción de ROS mitocondrial y en la biogénesis mitocondrial.
2. La capacidad OXPHOS está determinada por la combinación de los productos génicos nucleares y mitocondriales que generaran un ajuste estructural subóptimo determinado, siendo este una característica intrínseca del sistema, que denominamos *mismatch intrínseco* (MI).
3. El MI de la mETC induce una respuesta transcriptómica y metabólica adaptativa, que es específica de tejido y que afecta principalmente al metabolismo de lípidos, de carbohidratos y del glutatión.
4. El MI entre el nDNA/mtDNA es determinante en la calidad de envejecimiento, en tanto en cuanto tiene un impacto directo en el mantenimiento de la función mitocondrial, de la longitud telomérica y en la regulación de nutrientes (insulina) edad-dependiente.
5. Confirmando resultados de otros grupos, en una situación heteroplásmica en la que se enfrentan dos mtDNAs (C57BL/6 y NZB) a un mismo núcleo (C57BL/6), se manifiesta una segregación selectiva del mtDNA que responde a una dirección de selección específica de tejido e independiente de los niveles de heteroplasma iniciales.
6. En discrepancia con modelos anteriores, la segregación selectiva del mtDNA parece estar causada por las diferencias funcionales de la mETC consecuencia del MI.
7. El MI induce selección del mtDNA entre variantes no patológicas del mtDNA durante la transmisión intergeneracional en la línea germinal femenina.
8. El MI induce selección del mtDNA entre variantes no patológicas del mtDNA durante la transmisión intergeneracional en el desarrollo embrionario temprano.

Conclusions

1. Non-pathological mouse mtDNA variants from C57BL/6 and NZB mouse lines induce differences in OXPHOS capacity, ROS production and mitochondrial biogenesis upon conplastic interchange.
2. The double genetic origin of the respiratory complexes determines an array of alternative interaction modes between mtDNA-encoded and nDNA-encoded subunits that promotes variable performance. This is an intrinsic characteristic of the system that we call “intrinsic mismatch” (MI)
3. MI is able to induce a tissue-specific adaptive response, which is revealed at the transcriptomic and metabolomic levels and primarily affects lipid, carbohydrate and glutathione metabolism.
4. nDNA/mtDNA interplay impacts mitochondrial function, telomere length and insulin signaling. The MI thus affects quality of aging.
5. In agreement with previous results, there is a selective segregation of mtDNA when two variants of mtDNA (C57BL/6 and NZB) are confronted in the same nuclear background (C57BL/6). The selection direction is tissue specific, and does not require a particular threshold level.
6. Contrary to previous proposals, we found that selective somatic segregation of mtDNA is a consequence of functional differences produced by MI.
7. MI induces selection between mtDNA variants during intergenerational transmission in the female germline.
8. MI induces selection between mtDNA variants during intergenerational transmission in early embryo development.

Bibliografia

Acín-Pérez, R., and Enriquez, J.A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 444–450.

Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., and Enríquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular Cell* 32, 529–539.

Ahlqvist, K.J., Hämäläinen, R.H., Yatsuga, S., Uutela, M., Terzioglu, M., Götz, A., Forsström, S., Salven, P., Angers-Loustau, A., Kopra, O.H., et al. (2012). Somatic progenitor cell vulnerability to mitochondrial DNA mutagenesis underlies progeroid phenotypes in Polg mutator mice. *Cell Metabolism* 15, 100–109.

Al-Mehdi, A.-B., Pastukh, V.M., Swiger, B.M., Reed, D.J., Patel, M.R., Bardwell, G.C., Pastukh, V.V., Alexeyev, M.F., and Gillespie, M.N. (2012). Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Sci Signal* 5, ra47.

Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J. Cell Biol.*

Arranz, L., Urbano-Ispizúa, A., and Méndez-Ferrer, S. (2013). Mitochondria underlie different metabolism of hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica* 98, 993–995.

Baker, M.J., Lampe, P.A., Stojanovski, D., Korwitz, A., Anand, R., Tatsuta, T., and Langer, T. (2014). Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *The EMBO Journal*.

Ballard, J.W.O., and Whitlock, M.C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* 13, 729–744.

Battersby, B.J., and Shoubridge, E.A. (2001). Selection of a mtDNA sequence variant in hepatocytes of heteroplasmic mice is not due to differences in respiratory chain function or efficiency of replication. *Human Molecular Genetics* 10, 2469–2479.

Battersby, B.J., and Shoubridge, E.A. (2007). Reactive oxygen species and the segregation of mtDNA sequence variants. *Nature Genetics* 39, 571–2–authorreply572.

Battersby, B.J., Loredó-Osti, J.C., and Shoubridge, E.A. (2003). Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. *Nature Genetics* 33, 183–186.

Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., et al. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341–345.

Bär, F., Bochmann, W., Widok, A., Medem, von, K., Pagel, R., Hirose, M., Yu, X., Kalies, K., König, P., Böhm, R., et al. (2013). Mitochondrial gene polymorphisms that protect mice from colitis. *Gastroenterology* 145, 1055–1063.e3.

Berniakovich, I., Laricchia-Robbio, L., and Izpisua Belmonte, J.C. (2012). N-acetylcysteine protects induced pluripotent stem cells from in vitro stress: impact on differentiation outcome. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 729–735.

- Bestwick, M.L., and Shadel, G.S. (2013). Accessorizing the human mitochondrial transcription machinery. *Trends Biochem. Sci.* 38, 283–291.
- Blier, P.U., Dufresne, F., and Burton, R.S. (2001). Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genet.* 17, 400–406.
- Bolisetty, S., and Jaimes, E.A. (2013). Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci* 14, 6306–6344.
- Boutant, M., and Cantó, C. (2014). SIRT1 metabolic actions: Integrating recent advances from mouse models. *Mol Metab* 3, 5–18.
- Brown, M.D., Starikovskaya, E., Derbeneva, O., Hosseini, S., Allen, J.C., Mikhailovskaya, I.E., Sukernik, R.I., and Wallace, D.C. (2002). The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J. *Hum. Genet.* 110, 130–138.
- Brown, W.M., George, M., and Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1967–1971.
- Campello, S., and Scorrano, L. (2010). Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Reports* 11, 678–684.
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056–1060.
- Cantó, C., Houtkooper, R.H., Pirinen, E., Youn, D.Y., Oosterveer, M.H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P.J., Yamamoto, H., Andreux, P.A., Cettour-Rose, P., et al. (2012). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metabolism* 15, 838–847.
- Castri, L., Melendez-Obando, M., Villegas-Palma, R., Barrantes, R., Raventos, H., Pereira, R., Luiselli, D., Pettener, D., and Madrigal, L. (2009). Mitochondrial polymorphisms are associated both with increased and decreased longevity. *Hum. Hered.* 67, 147–153.
- Cavalier-Smith, T. (1987). Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 326, 332–333.
- CHANCE, B., and WILLIAMS, G.R. (1955). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176, 250–254.
- Chaudhari, P., Ye, Z., and Jang, Y.-Y. (2012). Roles of Reactive Oxygen Species in the Fate of Stem Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*.
- Chinnery, P.F., Mowbray, C., Patel, S.K., Elson, J.L., Sampson, M., Hitman, G.A., McCarthy, M.I., Hattersley, A.T., and Walker, M. (2007). Mitochondrial DNA haplogroups and type 2 diabetes: a study of 897 cases and 1010 controls. *J. Med. Genet.* 44, e80.
- Chinnery, P.F., Elliott, H.R., Hudson, G., Samuels, D.C., and Relton, C.L. (2012). Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol* 41, 177–187.
- Chu, H.-P., Liao, Y., Novak, J.S., Hu, Z., Merkin, J.J., Shymkiv, Y., Braeckman, B.P., Dorovkov, M.V., Nguyen, A., Clifford, P.M., et al. (2014). Germline Quality Control: eEF2K Stands Guard to Eliminate Defective Oocytes. *Developmental Cell*.

- Chuikov, S., Levi, B.P., Smith, M.L., and Morrison, S.J. (2010). Prdm16 promotes stem cell maintenance in multiple tissues, partly by regulating oxidative stress. *Nat. Cell Biol.* *12*, 999–1006.
- Clapper, D.L., Walseth, T.F., Dargie, P.J., and Lee, H.C. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J. Biol. Chem.* *262*, 9561–9568.
- Clavería, C., Giovino, G., Sierra, R., and Torres, M. (2013). Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* *500*, 39–44.
- Cochemé, H.M., Logan, A., Prime, T.A., Abakumova, I., Quin, C., McQuaker, S.J., Patel, J.V., Fearnley, I.M., James, A.M., Porteous, C.M., et al. (2012). Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living *Drosophila*. *Nat Protoc* *7*, 946–958.
- Cochemé, H.M., Quin, C., McQuaker, S.J., Cabreiro, F., Logan, A., Prime, T.A., Abakumova, I., Patel, J.V., Fearnley, I.M., James, A.M., et al. (2011). Measurement of H₂O₂ within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metabolism* *13*, 340–350.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., et al. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* *155*, 160–171.
- Collerton, J., Ashok, D., Martin-Ruiz, C., Pyle, A., Hudson, G., Yadegarfar, M., Davies, K., Jagger, C., Zglinicki, von, T., Kirkwood, T.B.L., et al. (2013). Frailty and mortality are not influenced by mitochondrial DNA haplotypes in the very old. *Neurobiol. Aging* *34*, 2889.e1–e4.
- Copeland, J.M., Cho, J., Lo, T., Hur, J.H., Bahadorani, S., Arabyan, T., Rabie, J., Soh, J., and Walker, D.W. (2009). Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain. *Curr. Biol.* *19*, 1591–1598.
- Craven, L., Tuppen, H.A., Greggains, G.D., Harbottle, S.J., Murphy, J.L., Cree, L.M., Murdoch, A.P., Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Lightowlers, R.N., et al. (2010). Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* *465*, 82–85.
- Cree, L.M., Samuels, D.C., de Sousa Lopes, S.C., Rajasimha, H.K., Wonnapijit, P., Mann, J.R., Dahl, H.-H.M., and Chinnery, P.F. (2008). A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nature Genetics* *40*, 249–254.
- Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L.M., Persechini, P.M., and Ojcius, D.M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* *282*, 2871–2879.
- Dai, Y., Zheng, K., Clark, J., Swerdlow, R.H., Pulst, S.M., Sutton, J.P., Shinobu, L.A., and Simon, D.K. (2014). Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation. *Human Molecular Genetics* *23*, 637–647.
- De Benedictis, G., Rose, G., Carrieri, G., De Luca, M., Falcone, E., Passarino, G., Bonafe, M., Monti, D., Baggio, G., Bertolini, S., et al. (1999). Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *Faseb J.* *13*, 1532–1536.
- Dell'agnello, C., Leo, S., Agostino, A., Szabadkai, G., Tiveron, C., Zulian, A., Prella, A.,

- Roubertoux, P., Rizzuto, R., and Zeviani, M. (2007). Increased longevity and refractoriness to Ca(2+)-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Human Molecular Genetics* 16, 431–444.
- Dietrich, M.O., Liu, Z.-W., and Horvath, T.L. (2013). Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate Agrp neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell* 155, 188–199.
- Dominy, J.E., Gerhart-Hines, Z., and Puigserver, P. (2011). Nutrient-dependent acetylation controls basic regulatory metabolic switches and cellular reprogramming. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76, 203–209.
- Dominy, J.E., and Puigserver, P. (2013). Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Dowling, D.K., Friberg, U., and Lindell, J. (2008). Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 23, 546–554.
- Dölle, C., Rack, J.G.M., and Ziegler, M. (2013). NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria. *Febs J.* 280, 3530–3541.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.
- Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M.T., and Palmer, C.S. (2013). Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 150–161.
- Elliott, H.R., Samuels, D.C., Eden, J.A., Relton, C.L., and Chinnery, P.F. (2008). Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 254–260.
- Embley, T.M., and Martin, W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440, 623–630.
- Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E., and Kozak, L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90–94.
- Fan, W., Waymire, K.G., Narula, N., Li, P., Rocher, C., Coskun, P.E., Vannan, M.A., Narula, J., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (2008). A Mouse Model of Mitochondrial Disease Reveals Germline Selection Against Severe mtDNA Mutations. *Science* 319, 958–962.
- Fan, W., Lin, C.S., Potluri, P., Procaccio, V., and Wallace, D.C. (2012). mtDNA lineage analysis of mouse L-cell lines reveals the accumulation of multiple mtDNA mutants and intermolecular recombination. *Genes Dev.* 26, 384–394.
- Fetterman, J.L., Zelickson, B.R., Johnson, L.W., Moellering, D.R., Westbrook, D.G., Pompilius, M., Sammy, M.J., Johnson, M., Dunham-Snary, K.J., Cao, X., et al. (2013). Mitochondrial genetic background modulates bioenergetics and susceptibility to acute cardiac volume overload. *Biochem. J.* 455, 157–167.
- Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., and Blasco, M.A. (2008). The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* 22, 654–667.
- Folmes, C.D.L., Martinez-Fernandez, A., Perales-Clemente, E., Li, X., McDonald, A., Oglesbee, D., Hrstka, S.C., Perez-Terzic, C., Terzic, A., and Nelson, T.J. (2013). Disease-

causing mitochondrial heteroplasmy segregated within induced pluripotent stem cell clones derived from a patient with MELAS. *Stem Cells* 31, 1298–1308.

Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L., and Cuezva, J.M. (2012). The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Molecular Cell* 45, 731–742.

Forner, F., Foster, L.J., Campanaro, S., Valle, G., and Mann, M. (2006). Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. *Mol. Cell Proteomics* 5, 608–619.

Fornuskova, D., Stiburek, L., Wenchich, L., Vinsova, K., Hansikova, H., and Zeman, J. (2010). Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b. *Biochem. J.* 428, 363–374.

Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319–324.

Freyer, C., Cree, L.M., Mourier, A., Stewart, J.B., Koolmeister, C., Milenkovic, D., Wai, T., Floros, V.I., Hagström, E., Chatzidaki, E.E., et al. (2012). Chinnery 2012. *Nature Genetics* 44, 1282–1285.

Frezza, C., Cipolat, S., and Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* 2, 287–295.

Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358–362.

Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J.-W., Shimoda, L., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129, 111–122.

Gallach, M., Chandrasekaran, C., and Betrán, E. (2010). Analyses of nuclearly encoded mitochondrial genes suggest gene duplication as a mechanism for resolving intralocus sexually antagonistic conflict in *Drosophila*. *Genome Biol Evol* 2, 835–850.

Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., and Hurst, G.D.D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* 18, 4541–4550.

García, O., Almeida, A., Massieu, L., and Bolaños, J.P. (2005). Increased mitochondrial respiration maintains the mitochondrial membrane potential and promotes survival of cerebellar neurons in an endogenous model of glutamate receptor activation. *J. Neurochem.* 92, 183–190.

García-Prat, L., Sousa-Victor, P., and Muñoz-Cánoves, P. (2013). Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *Febs J.* 280, 4051–4062.

Genova, M.L., and Lenaz, G. (2014). Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 427–443.

Gerdes, F., Tatsuta, T., and Langer, T. (2012). Mitochondrial AAA proteases--towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 49–55.

Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., and Wallace, D.C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 6715–6719.

Gleyzer, N., Vercauteren, K., and Scarpulla, R.C. (2005). Control of mitochondrial transcription

specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Molecular and Cellular Biology* 25, 1354–1366.

Gomes, A.P., Price, N.L., Ling, A.J.Y., Moslehi, J.J., Montgomery, M.K., Rajman, L., White, J.P., Teodoro, J.S., Wrann, C.D., Hubbard, B.P., et al. (2013). Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* 155, 1624–1638.

Gomes, L.C., Di Benedetto, G., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13, 589–598.

González-Suárez, E., Samper, E., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2000). Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nature Genetics* 26, 114–117.

Gómez-Durán, A., Pacheu-Grau, D., Martínez-Romero, I., López-Gallardo, E., López-Pérez, M.J., Montoya, J., and Ruiz-Pesini, E. (2012). Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1216–1222.

Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., and Gupte, S.S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18, 331–368.

Hadjivasiliou, Z., Pomiankowski, A., Seymour, R.M., and Lane, N. (2012). Selection for mitonuclear co-adaptation could favour the evolution of two sexes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 1865–1872.

Hagström, E., Freyer, C., Battersby, B.J., Stewart, J.B., and Larsson, N.-G. (2014). No recombination of mtDNA after heteroplasmy for 50 generations in the mouse maternal germline. *Nucleic Acids Res.* 42, 1111–1116.

Hall, J.A., Dominy, J.E., Lee, Y., and Puigserver, P. (2013). The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J. Clin. Invest.* 123, 973–979.

Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* 35, 505–513.

Hamilton, B., Dong, Y., Shindo, M., Liu, W., Odell, I., Ruvkun, G., and Lee, S.S. (2005). A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev.* 19, 1544–1555.

Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262.

Hauswirth, W.W., and Laipis, P.J. (1982). Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4686–4690.

Hayashi, J., Ohta, S., Kikuchi, A., Takemitsu, M., Goto, Y., and Nonaka, I. (1991). Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10614–10618.

Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnóczky, G., and Su, T.-P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends in Cell Biology* 19, 81–88.

Hämäläinen, R.H., Manninen, T., Koivumäki, H., Kislin, M., Otonkoski, T., and Suomalainen, A. (2013). Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U.S.a. 110, E3622–E3630.

Herranz, D., Muñoz-Martin, M., Cañamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* 1, 3.

Herrera, E., Samper, E., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Lee, H.W., and Blasco, M.A. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *The EMBO Journal* 18, 2950–2960.

Hill, J.H., Chen, Z., and Xu, H. (2014). Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. *Nature Genetics*.

Holt, I.J., Harding, A.E., and Morgan-Hughes, J.A. (1988a). Mitochondrial DNA polymorphism in mitochondrial myopathy. *Hum. Genet.* 79, 53–57.

Holt, I.J., Harding, A.E., and Morgan-Hughes, J.A. (1988b). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331, 717–719.

Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 751–780.

Hori, A., Yoshida, M., Shibata, T., and Ling, F. (2009). Reactive oxygen species regulate DNA copy number in isolated yeast mitochondria by triggering recombination-mediated replication. *Nucleic Acids Res.* 37, 749–761.

Houštek, J., Hejzlarová, K., Vrbacký, M., Drahota, Z., Landa, V., Zidek, V., Mlejnek, P., Šimáková, M., Šilhavy, J., Mikšík, I., et al. (2012). Nonsynonymous variants in mt-Nd2, mt-Nd4, and mt-Nd5 are linked to effects on oxidative phosphorylation and insulin sensitivity in rat conplastic strains. *Physiol. Genomics* 44, 487–494.

Houtkooper, R.H., Mouchiroud, L., Ryu, D., Moullan, N., Katsyuba, E., Knott, G., Williams, R.W., and Auwerx, J. (2013). Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* 497, 451–457.

Houtkooper, R.H., Pirinen, E., and Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 225–238.

Houtkooper, R.H., Williams, R.W., and Auwerx, J. (2010). Metabolic networks of longevity. *Cell* 142, 9–14.

Hudson, G., Nalls, M., Evans, J.R., Breen, D.P., Winder-Rhodes, S., Morrison, K.E., Morris, H.R., Williams-Gray, C.H., Barker, R.A., Singleton, A.B., et al. (2013). Two-stage association study and meta-analysis of mitochondrial DNA variants in Parkinson disease. *Neurology* 80, 2042–2048.

Ishikawa, K., Toyama-Sorimachi, N., Nakada, K., Morimoto, M., Imanishi, H., Yoshizaki, M., Sasawatari, S., Niikura, M., Takenaga, K., Yonekawa, H., et al. (2010). The innate immune system in host mice targets cells with allogenic mitochondrial DNA. *J. Exp. Med.* 207, 2297–2305.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 997–1002.

- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., et al. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* *12*, 446–451.
- Jacobs, L., Gerards, M., Chinnery, P., Dumoulin, J., de Coo, I., Geraedts, J., and Smeets, H. (2007). mtDNA point mutations are present at various levels of heteroplasmy in human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* *13*, 149–154.
- Jang, Y.-Y., and Sharkis, S.J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* *110*, 3056–3063.
- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 12017–12022.
- Jenuth, J.P., Peterson, A.C., and Shoubridge, E.A. (1997). Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nature Genetics* *16*, 93–95.
- Jenuth, J.P., Peterson, A.C., Fu, K., and Shoubridge, E.A. (1996). Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nature Genetics* *14*, 146–151.
- Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., and Youle, R.J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J. Cell Biol.* *191*, 933–942.
- Johnson, K.R., Zheng, Q.Y., Bykhovskaya, Y., Spirina, O., and Fischel-Ghodsian, N. (2001). A nuclear-mitochondrial DNA interaction affecting hearing impairment in mice. *Nature Genetics* *27*, 191–194.
- Jokinen, R., and Battersby, B.J. (2013). Insight into mammalian mitochondrial DNA segregation. *Ann Med* *45*, 149–155.
- Jokinen, R., Marttinen, P., Sandell, H.K., Manninen, T., Teerenhovi, H., Wai, T., Teoli, D., Loredó-Osti, J.C., Shoubridge, E.A., and Battersby, B.J. (2010). Gimap3 regulates tissue-specific mitochondrial DNA segregation. *PLoS Genet* *6*, e1001161.
- Jovaisaite, V., Mouchiroud, L., and Auwerx, J. (2014). The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *J. Exp. Biol.* *217*, 137–143.
- Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* *13*, 2570–2580.
- Kaufmann, P., Engelstad, K., Wei, Y., Jhung, S., Sano, M.C., Shungu, D.C., Millar, W.S., Hong, X., Gooch, C.L., Mao, X., et al. (2006). Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology* *66*, 324–330.
- Khairallah, M., Labarthe, F., Bouchard, B., Danialou, G., Petrof, B.J., and Rosiers, Des, C. (2004). Profiling substrate fluxes in the isolated working mouse heart using ¹³C-labeled substrates: focusing on the origin and fate of pyruvate and citrate carbons. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *286*, H1461–H1470.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo,

- A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., et al. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481–484.
- Kumarasamy, S., Gopalakrishnan, K., Abdul-Majeed, S., Partow-Navid, R., Farms, P., and Joe, B. (2013). Construction of two novel reciprocal conplastic rat strains and characterization of cardiac mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304, H22–H32.
- Kumarasamy, S., Gopalakrishnan, K., Shafton, A., Nixon, J., Thangavel, J., Farms, P., and Joe, B. (2010). Mitochondrial polymorphisms in rat genetic models of hypertension. *Mamm. Genome* 21, 299–306.
- Lane, N. (2011). Mitonuclear match: Optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations. *Bioessays* 33, 860–869.
- Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P.M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M.A., et al. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567–1570.
- Larsson, N.G., Eiken, H.G., Boman, H., Holme, E., Oldfors, A., and Tulinius, M.H. (1992). Lack of transmission of deleted mtDNA from a woman with Kearns-Sayre syndrome to her child. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 360–363.
- Lee, H.-S., Ma, H., Juanes, R.C., Tachibana, M., Sparman, M., Woodward, J., Ramsey, C., Xu, J., Kang, E.-J., Amato, P., et al. (2012). Rapid Mitochondrial DNA Segregation in Primate Preimplantation Embryos Precedes Somatic and Germline Bottleneck. *Cell Reports* 1, 506–515.
- Lenaz, G. (2011). Mitochondria and Reactive Oxygen Species. Which Role in Physiology and Pathology? In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 93–136.
- Li, Y., He, L., Zeng, N., Sahu, D., Cadenas, E., Shearn, C., Li, W., and Stiles, B.L. (2013). Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) signaling regulates mitochondrial biogenesis and respiration via estrogen-related receptor α (ERR α). *J. Biol. Chem.* 288, 25007–25024.
- Liesa, M., and Shrihail, O.S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metabolism* 17, 491–506.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., and Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1491–1508.
- Lin, J., Wu, P.-H., Tarr, P.T., Lindenberg, K.S., St-Pierre, J., Zhang, C.-Y., Mootha, V.K., Jäger, S., Vianna, C.R., Reznick, R.M., et al. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell* 119, 121–135.
- Liou, C.-W., Chen, J.-B., Tiao, M.-M., Weng, S.-W., Huang, T.-L., Chuang, J.-H., Chen, S.-D., Chuang, Y.-C., Lee, W.-C., Lin, T.-K., et al. (2012). Mitochondrial DNA coding and control region variants as genetic risk factors for type 2 diabetes. *Diabetes* 61, 2642–2651.
- Liu, X., Weaver, D., Shrihail, O., and Hajnóczky, G. (2009). Mitochondrial “kiss-and-run”: interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *The EMBO Journal* 28, 3074–3089.
- Logan, D.C. (2007). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 58, 1225–1243.

- Lorente, L., Iceta, R., Martín, M.M., López-Gallardo, E., Solé-Violán, J., Blanquer, J., Labarta, L., Díaz, C., Jiménez, A., Montoya, J., et al. (2012). Survival and mitochondrial function in septic patients according to mitochondrial DNA haplogroup. *Crit Care* 16, R10.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217.
- Malena, A., Loro, E., Di Re, M., Holt, I.J., and Vergani, L. (2009). Inhibition of mitochondrial fission favours mutant over wild-type mitochondrial DNA. *Human Molecular Genetics* 18, 3407–3416.
- Manfredi, G., Gupta, N., Vazquez-Memije, M.E., Sadlock, J.E., Spinazzola, A., De Vivo, D.C., and Schon, E.A. (1999). Oligomycin induces a decrease in the cellular content of a pathogenic mutation in the human mitochondrial ATPase 6 gene. *J. Biol. Chem.* 274, 9386–9391.
- Mannella, C.A., Lederer, W.J., and Jafri, M.S. (2013). The connection between inner membrane topology and mitochondrial function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 62, 51–57.
- Marchi, S., Patergnani, S., and Pinton, P. (2014). The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 461–469.
- Marriage, B.J., Clandinin, M.T., Macdonald, I.M., and Glerum, D.M. (2004). Cofactor treatment improves ATP synthetic capacity in patients with oxidative phosphorylation disorders. *Mol. Genet. Metab.* 81, 263–272.
- Mehta, P., Mellick, G.D., Rowe, D.B., Halliday, G.M., Jones, M.M., Manwaring, N., Vandebona, H., Silburn, P.A., Wang, J.J., Mitchell, P., et al. (2009). Mitochondrial DNA haplogroups J and K are not protective for Parkinson's disease in the Australian community. *Mov. Disord.* 24, 290–292.
- Merritt, M.E., Harrison, C., Sherry, A.D., Malloy, C.R., and Burgess, S.C. (2011). Flux through hepatic pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase detected by hyperpolarized ¹³C magnetic resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 19084–19089.
- Miquel, E., Cassina, A., Martínez-Palma, L., Bolatto, C., Trías, E., Gandelman, M., Radi, R., Barbeito, L., and Cassina, P. (2012). Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 7, e34776.
- MITCHELL, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- Mitchell, S.J., Martin-Montalvo, A., Mercken, E.M., Palacios, H.H., Ward, T.M., Abulwerdi, G., Minor, R.K., Vlasuk, G.P., Ellis, J.L., Sinclair, D.A., et al. (2014). The SIRT1 activator SRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet. *Cell Reports* 6, 836–843.
- Molina, A.J.A., Wikstrom, J.D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E., et al. (2009). Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 58, 2303–2315.
- Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Movilla, N., Pérez-Martos, A., Rodríguez de Cordoba, S., Gallardo, M.E., and Enriquez, J.A. (2006). Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nature Genetics* 38, 1261–1268.

- Mossman, J.A., Slate, J., Birkhead, T.R., Moore, H.D., and Pacey, A.A. (2012). Mitochondrial haplotype does not influence sperm motility in a UK population of men. *Hum. Reprod.* 27, 641–651.
- Mouchiroud, L., Houtkooper, R.H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Cantó, C., Mottis, A., Jo, Y.-S., Viswanathan, M., Schoonjans, K., et al. (2013). The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell* 154, 430–441.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1.
- Nabholz, B., Mauffrey, J.-F., Bazin, E., Galtier, N., and Glemin, S. (2008). Determination of mitochondrial genetic diversity in mammals. *Genetics* 178, 351–361.
- Nardelli, C., Labruna, G., Liguori, R., Mazzaccara, C., Ferrigno, M., Capobianco, V., Pezzuti, M., Castaldo, G., Farinaro, E., Contaldo, F., et al. (2013). Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed Res Int* 2013, 631082.
- Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723–749.
- Niemi, A.-K., Hervonen, A., Hurme, M., Karhunen, P.J., Jylhä, M., and Majamaa, K. (2003). Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum. Genet.* 112, 29–33.
- Nishigaki, Y., Fuku, N., and Tanaka, M. (2010). Mitochondrial haplogroups associated with lifestyle-related diseases and longevity in the Japanese population. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1, S221–S235.
- Nolden, M., Ehses, S., Koppen, M., Bernacchia, A., Rugarli, E.I., and Langer, T. (2005). The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* 123, 277–289.
- Okuno, D., Iino, R., and Noji, H. (2011). Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. *J. Biochem.* 149, 655–664.
- Owusu-Ansah, E., and Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537–541.
- Owusu-Ansah, E., Song, W., and Perrimon, N. (2013). Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. *Cell* 155, 699–712.
- Pacheu-Grau, D., Gómez-Durán, A., Montoya, J., and Ruiz-Pesini, E. (2010). Influence of mtDNA genetic variation on antibiotic therapy. *Pharmacogenomics* 11, 1185–1187.
- Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.-E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., et al. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134, 112–123.
- Pakendorf, B., and Stoneking, M. (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 165–183.
- PALADE, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* 1, 188–211.

- Parmakelis, A., Kotsakiozi, P., and Rand, D. (2013). Correction: Animal Mitochondria, Positive Selection and Cyto-Nuclear Coevolution: Insights from Pulmonates. *PLoS ONE* 8.
- Pello, R., Martín, M.A., Carelli, V., Nijtmans, L.G., Achilli, A., Pala, M., Torroni, A., Gómez-Durán, A., Ruiz-Pesini, E., Martinuzzi, A., et al. (2008). Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Human Molecular Genetics* 17, 4001–4011.
- Pettan-Brewer, C., and Treuting, P.M. (2011). Practical pathology of aging mice. *Pathobiol Aging Age Relat Dis* 1.
- Picard, M., Shirihai, O.S., Gentil, B.J., and Burelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R393–R406.
- Poulton, J., Luan, J., Macaulay, V., Hennings, S., Mitchell, J., and Wareham, N.J. (2002). Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Human Molecular Genetics* 11, 1581–1583.
- Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, B.M. (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286, 1368–1371.
- Pyle, A., Taylor, R.W., Durham, S.E., Deschauer, M., Schaefer, A.M., Samuels, D.C., and Chinnery, P.F. (2007). Depletion of mitochondrial DNA in leucocytes harbouring the 3243A->G mtDNA mutation. *J. Med. Genet.* 44, 69–74.
- Quirós, P.M., Ramsay, A.J., Sala, D., ndez-Vizarra, E.F.A., guez, F.R.I., Peinado, J.R., a, M.S.F.A.N.-G.I., Vega, J.E.A., quez, J.E.A.E.I., Zorzano, A., et al. (2012). Lopez-otín OMA1 2012. *The EMBO Journal* 31, 2117–2133.
- Rackham, O., and Filipovska, A. (2014). Supernumerary proteins of mitochondrial ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1227–1232.
- Rahman, S., Poulton, J., Marchington, D., and Suomalainen, A. (2001). Decrease of 3243 A->G mtDNA mutation from blood in MELAS syndrome: a longitudinal study. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 238–240.
- Raimundo, N., Song, L., Shutt, T.E., McKay, S.E., Cotney, J., Guan, M.-X., Gilliland, T.C., Hohuan, D., Santos-Sacchi, J., and Shadel, G.S. (2012). Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness. *Cell* 148, 716–726.
- Rajasimha, H.K., Chinnery, P.F., and Samuels, D.C. (2008). Selection against Pathogenic mtDNA Mutations in a Stem Cell Population Leads to the Loss of the 3243A→G Mutation in Blood. *The American Journal of Human Genetics* 82, 333–343.
- Ramos, A., Santos, C., Mateiu, L., Gonzalez, M.D.M., Alvarez, L., Azevedo, L., Amorim, A., and Aluja, M.P. (2013). Frequency and pattern of heteroplasmy in the complete human mitochondrial genome. *PLoS ONE* 8, e74636.
- Ridge, P.G., Koop, A., Maxwell, T.J., Bailey, M.H., Swerdlow, R.H., Kauwe, J.S.K., Honea, R.A., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2013). Mitochondrial haplotypes associated with biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 8, e74158.
- Ridge, P.G., Maxwell, T.J., Corcoran, C.D., Norton, M.C., Tschanz, J.T., O'Brien, E., Kerber, R.A., Cawthon, R.M., Munger, R.G., and Kauwe, J.S.K. (2012). Mitochondrial genomic

analysis of late onset Alzheimer's disease reveals protective haplogroups H6A1A/H6A1B: the Cache County Study on Memory in Aging. *PLoS ONE* 7, e45134.

Ristow, M., and Schmeisser, S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 51, 327–336.

Roberts, L.D., Boström, P., O'Sullivan, J.F., Schinzel, R.T., Lewis, G.D., Dejam, A., Lee, Y.-K., Palma, M.J., Calhoun, S., Georgiadi, A., et al. (2014). β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metabolism* 19, 96–108.

Ross, J.M., Stewart, J.B., Hagström, E., Brené, S., Mourier, A., Coppotelli, G., Freyer, C., Lagouge, M., Hoffer, B.J., Olson, L., et al. (2013). Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nature* 501, 412–415.

Roubertoux, P.L., Sluyter, F., Carlier, M., Marcet, B., Maarouf-Veray, F., Chérif, C., Marican, C., Arrechi, P., Godin, F., Jamon, M., et al. (2003). Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nature Genetics* 35, 65–69.

Ruiz-Pesini, E., Lapeña, A.C., Díez-Sánchez, C., Pérez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Díaz, M., Urriés, A., Montoro, L., López-Pérez, M.J., et al. (2000). Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 682–696.

Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V., and Wallace, D.C. (2004). Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303, 223–226.

Santoro, A., Balbi, V., Balducci, E., Pirazzini, C., Rosini, F., Tavano, F., Achilli, A., Siviero, P., Minicuci, N., Bellavista, E., et al. (2010). Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 5, e12037.

Santra, S., Gilkerson, R.W., Davidson, M., and Schon, E.A. (2004). Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells. *Ann Neurol.* 56, 662–669.

Satoh, A., Brace, C.S., Rensing, N., Cliften, P., Wozniak, D.F., Herzog, E.D., Yamada, K.A., and Imai, S.-I. (2013). Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metabolism* 18, 416–430.

Satoh, M., and Kuroiwa, T. (1991). Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp. Cell Res.* 196, 137–140.

Sánchez-Aragó, M., García-Bermúdez, J., Martínez-Reyes, I., Santacatterina, F., and Cuezva, J.M. (2013). Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells. *EMBO Reports* 14, 638–644.

Scarpulla, R.C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* 97, 673–683.

Schaefer, A.M., McFarland, R., Blakely, E.L., He, L., Whittaker, R.G., Taylor, R.W., Chinnery, P.F., and Turnbull, D.M. (2008). Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol.* 63, 35–39.

Scheffler, K., Krohn, M., Dunkelmann, T., Stenzel, J., Miroux, B., Ibrahim, S., Bohlen und Halbach, O., Heinze, H.-J., Walker, L.C., Gsponer, J.A., et al. (2012). Mitochondrial DNA polymorphisms specifically modify cerebral β -amyloid proteostasis. *Acta Neuropathol* 124, 199–208.

- Schon, E.A., DiMauro, S., Hirano, M., and Gilkerson, R.W. (2010). Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends in Molecular Medicine* 16, 268–276.
- Selesniemi, K., Lee, H.-J., Muhlhauser, A., and Tilly, J.L. (2011). Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12319–12324.
- Sena, L.A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D.A., Wang, C.-R., Schumacker, P.T., Licht, J.D., Perlman, H., et al. (2013). Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* 38, 225–236.
- Sethumadhavan, S., Vasquez-Vivar, J., Migrino, R.Q., Harmann, L., Jacob, H.J., and Lazar, J. (2012). Mitochondrial DNA variant for complex I reveals a role in diabetic cardiac remodeling. *J. Biol. Chem.* 287, 22174–22182.
- Sharpley, M.S., Marciniak, C., Eckel-Mahan, K., McManus, M., Crimi, M., Waymire, K., Lin, C.S., Masubuchi, S., Friend, N., Koike, M., et al. (2012). Heteroplasmy of Mouse mtDNA Is Genetically Unstable and Results in Altered Behavior and Cognition. *Cell* 151, 333–343.
- Shea, K., and Geijsen, N. (2007). Dissection of 6.5 dpc mouse embryos. *J Vis Exp* 160.
- Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M., Seibel, P., Ballinger, S.W., and Wallace, D.C. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61, 931–937.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., et al. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13207–13212.
- Smith, R.A.J., Adlam, V.J., Blaikie, F.H., Manas, A.-R.B., Porteous, C.M., James, A.M., Ross, M.F., Logan, A., Cochemé, H.M., Trnka, J., et al. (2008). Mitochondria-targeted antioxidants in the treatment of disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 105–111.
- Soga, T., Baran, R., Suematsu, M., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Kakazu, Y., Ishikawa, T., Robert, M., Nishioka, T., et al. (2006). Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J. Biol. Chem.* 281, 16768–16776.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., et al. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397–408.
- Stewart, J.B., Freyer, C., Elson, J.L., and Larsson, N.-G. (2008a). Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 657–662.
- Stewart, J.B., Freyer, C., Elson, J.L., Wredenberg, A., Cansu, Z., Trifunovic, A., and Larsson, N.-G. (2008b). Strong Purifying Selection in Transmission of Mammalian Mitochondrial DNA. *Plos Biol* 6, e10.
- Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., and Stuart, R.A. (2012). Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex. *Molecular and Cellular Biology* 32, 1363–1373.
- Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem

cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9, 298–310.

Suen, D.-F., Narendra, D.P., Tanaka, A., Manfredi, G., and Youle, R.J. (2010). Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11835–11840.

Szablowska-Gadomska, I., Zayat, V., and Buzanska, L. (2011). Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71, 86–93.

Tai-Nagara, I., Matsuoka, S., Ariga, H., and Suda, T. (2014). Mortalin and DJ-1 coordinately regulate hematopoietic stem cell function through the control of oxidative stress. *Blood* 123, 41–50.

Takasaki, S. (2009). Mitochondrial haplogroups associated with Japanese Alzheimer's patients. *J Bioenerg Biomembr* 41, 407–410.

Tcherepanova, I., Puigserver, P., Norris, J.D., Spiegelman, B.M., and McDonnell, D.P. (2000). Modulation of estrogen receptor- α transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J. Biol. Chem.* 275, 16302–16308.

Tilly, J.L., and Sinclair, D.A. (2013). Germline energetics, aging, and female infertility. *Cell Metabolism* 17, 838–850.

Tormos, K.V., Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., and Chandel, N.S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metabolism* 14, 537–544.

Torrioni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinu, D., Savontaus, M.L., and Wallace, D.C. (1996). Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144, 1835–1850.

Tranah, G.J., Nalls, M.A., Katzman, S.M., Yokoyama, J.S., Lam, E.T., Zhao, Y., Mooney, S., Thomas, F., Newman, A.B., Liu, Y., et al. (2012). Mitochondrial DNA sequence variation associated with dementia and cognitive function in the elderly. *J. Alzheimers Dis.* 32, 357–372.

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417–423.

Twig, G., Hyde, B., and Shirihai, O.S. (2008). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1092–1097.

Ueda, K., and Hayaishi, O. (1985). ADP-ribosylation. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 73–100.

Varela, I., Cadiñanos, J., Pendás, A.M., Gutiérrez-Fernández, A., Folgueras, A.R., Sánchez, L.M., Zhou, Z., Rodríguez, F.J., Stewart, C.L., Vega, J.A., et al. (2005). Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437, 564–568.

Vera, E., Bernardes de Jesus, B., Foronda, M., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2012). The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Reports* 2, 732–737.

Vijg, J., and Campisi, J. (2008). Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* 454, 1065–1071.

Vives-Bauza, C., Yang, L., and Manfredi, G. (2007). Assay of mitochondrial ATP synthesis in

animal cells and tissues. *Methods Cell Biol.* 80, 155–171.

Wai, T., Teoli, D., and Shoubbridge, E.A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genetics* 40, 1484–1488.

Wallace, D.C., Brown, M.D., and Lott, M.T. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238, 211–230.

Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J., and Nikoskelainen, E.K. (1988a). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242, 1427–1430.

Wallace, D.C., Zheng, X.X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., Epstein, C.M., and Hopkins, L.C. (1988b). Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 55, 601–610.

Wang, R., Dillon, C.P., Shi, L.Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., et al. (2011). The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 35, 871–882.

Wartiovaara, A., and Syvänen, A.-C. (2002). Analysis of nucleotide sequence variations by solid-phase minisequencing. *Methods Mol. Biol.* 187, 57–63.

Wasilewski, M., and Scorrano, L. (2009). The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 287–294.

Weber, K., Wilson, J.N., Taylor, L., Brierley, E., Johnson, M.A., Turnbull, D.M., and Bindoff, L.A. (1997). A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 373–380.

Wenz, T. (2013). Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 α under cellular stress. *Mitochondrion* 13, 134–142.

Wenz, T., Diaz, F., Spiegelman, B.M., and Moraes, C.T. (2008). Activation of the PPAR/PGC-1 α pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metabolism* 8, 249–256.

Woltjen, K., Härmäläinen, R., Kibschull, M., Mileikovsky, M., and Nagy, A. (2011). Transgene-free production of pluripotent stem cells using piggyBac transposons. *Methods Mol. Biol.* 767, 87–103.

Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Härmäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770.

Wu, C.-A., Chao, Y., Shiah, S.-G., and Lin, W.-W. (2013). Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 1147–1156.

Xu, X., Duan, S., Yi, F., Ocampo, A., Liu, G.-H., and Izpisua Belmonte, J.C. (2013). Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metabolism* 18, 325–332.

Yang, T.-L., Guo, Y., Shen, H., Lei, S.-F., Liu, Y.-J., Li, J., Liu, Y.-Z., Yu, N., Chen, J., Xu, T., et al. (2011). Genetic association study of common mitochondrial variants on body fat mass. *PLoS ONE* 6, e21595.

- Yang, W., and Hekimi, S. (2010). A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Biol* 8, e1000556.
- Yatsuga, S., and Suomalainen, A. (2012). Effect of bezafibrate treatment on late-onset mitochondrial myopathy in mice. *Human Molecular Genetics* 21, 526–535.
- Yoneda, M., Chomyn, A., Martinuzzi, A., Hurko, O., and Attardi, G. (1992). Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11164–11168.
- Youle, R.J., and van der Blik, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062–1065.
- Yu, X., Gimsa, U., Wester-Rosenlöf, L., Kanitz, E., Otten, W., Kunz, M., and Ibrahim, S.M. (2009). Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Res.* 19, 159–165.
- Yun, J., and Finkel, T. (2014). Mitohormesis. *Cell Metabolism*.
- Zijlmans, J.M., Martens, U.M., Poon, S.S., Raap, A.K., Tanke, H.J., Ward, R.K., and Lansdorp, P.M. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7423–7428.
- Zuin, A., Castellano-Esteve, D., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2010). Living on the edge: stress and activation of stress responses promote lifespan extension. *Aging (Albany NY)* 2, 231–237.